

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-062261

(43)Date of publication of application : 28.02.2002

(51)Int.Cl.

G01N 21/64
G01J 3/443
G02B 21/00
G02B 21/06
// G01N 21/17

(21)Application number : 2000-249320

(71)Applicant : OLYMPUS OPTICAL CO LTD

(22)Date of filing : 21.08.2000

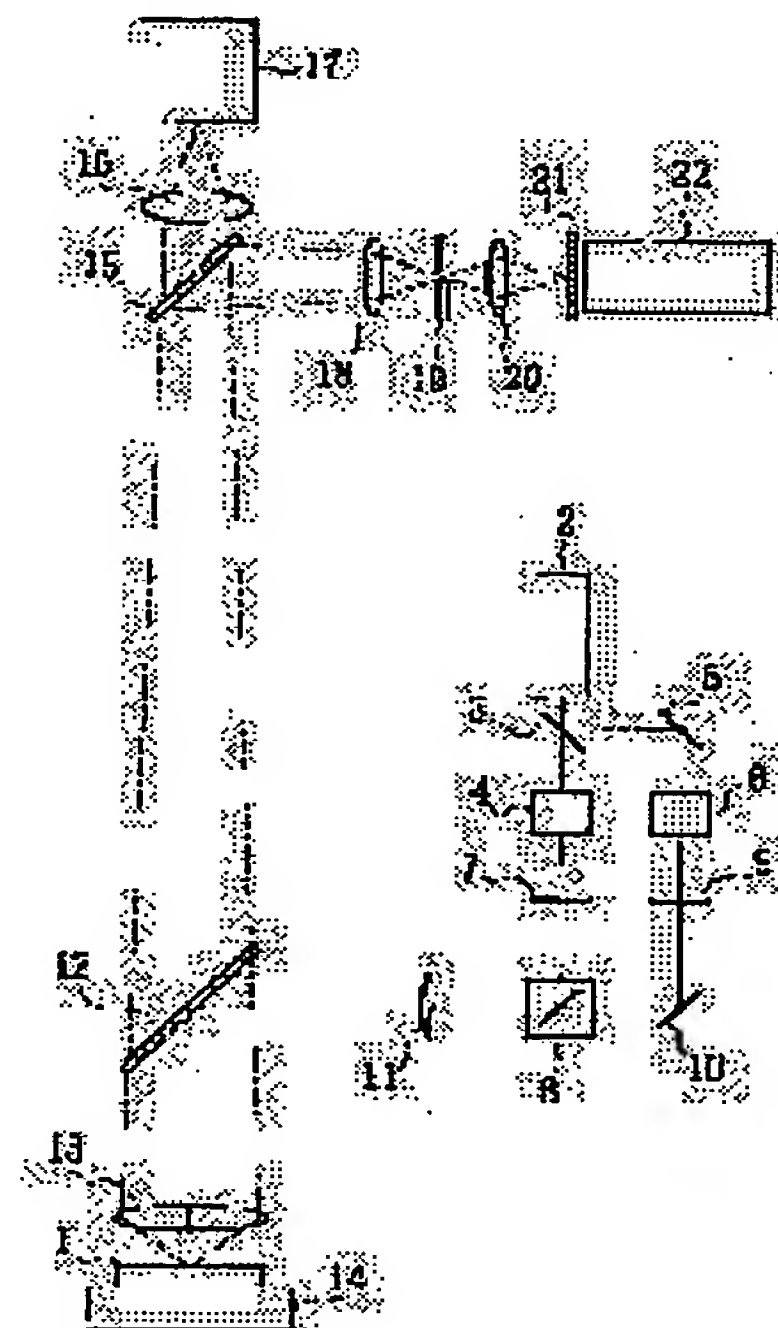
(72)Inventor : IKETAKI YOSHINORI

(54) OPTICAL SYSTEM AND MICROSCOPE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To make a super-resolution property excellent in image-forming performance exhibited easily by simple constitution.

SOLUTION: This system has light source means 2, 3, 4, 6, 8 for generating plural lights different in wavelengths, a converging means 13 for converging the plural lights toward an object 1, and a photodetecting means 17 for detecting the lights emitted from the object 1. At least one light out of the plural lights different in their wavelengths generated by the light source means is constituted to be converged as the light for forming a converged pattern of a multi-spatial mode and to make the plural lights overlapped only in a partial area of the converged pattern of the multi-spatial mode spatially with a converged pattern of the another light by the converging means 13.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-62261

(P2002-62261A)

(43) 公開日 平成14年2月28日 (2002.2.28)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト (参考)
G 0 1 N 21/64		G 0 1 N 21/64	E 2 G 0 2 0
			F 2 G 0 4 3
G 0 1 J 3/443		G 0 1 J 3/443	2 G 0 5 9
G 0 2 B 21/00		G 0 2 B 21/00	2 H 0 5 2
21/06		21/06	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-249320(P2000-249320)

(22) 出願日 平成12年8月21日 (2000.8.21)

(71) 出願人 000000376

オリンパス光学工業株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

(72) 発明者 池滝 慶記

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリンパス光学工業株式会社内

(74) 代理人 100059258

弁理士 杉村 暁秀 (外2名)

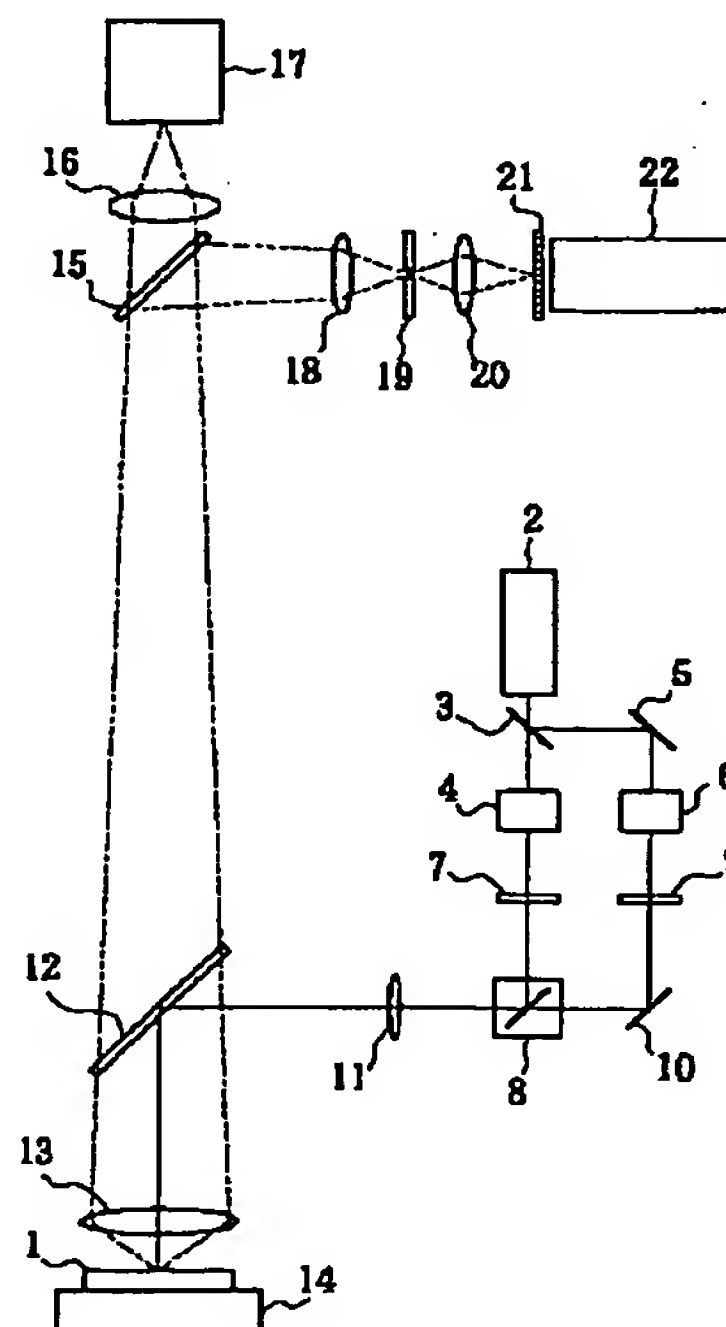
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光学装置および顕微鏡

(57) 【要約】

【課題】 簡単な構成で、結像性能の良好な超解像性を容易に発現できる光学装置および顕微鏡を提供する。

【解決手段】 波長の異なる複数の光を発生する光源手段 (2, 3, 4, 6, 8) と、上記複数の光を対象1に集光する集光手段13と、上記対象1から発せられる光を検出する発光検出手段17とを有し、上記光源手段から発生する波長の異なる複数の光のうち、少なくとも1つの光はマルチ空間モードの集光パターンが形成される光として、これら複数の光を上記集光手段13により上記マルチ空間モードの集光パターンの一部領域のみが他の光の集光パターンと空間的に重ね合わされるように上記対象1に集光させるよう構成する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 波長の異なる複数の光を発生する光源手段と、

上記複数の光を対象に集光する集光手段と、

上記対象から発せられる光を検出する発光検出手段とを有し、

上記光源手段から発生する波長の異なる複数の光のうち、少なくとも1つの光はマルチ空間モードの集光パターンが形成される光として、これら複数の光を上記集光手段により上記マルチ空間モードの集光パターンの一部領域のみが他の光の集光パターンと空間的に重ね合わされるように上記対象に集光させるよう構成したことを特徴とする光学装置。

【請求項2】 少なくとも基底状態を含め3つの電子状態を有する分子で染色した試料を観察する顕微鏡であって、

上記分子を基底状態から第1の励起状態へ遷移させる波長 λ_1 の第1の光を発生する第1の光源と、

上記分子を上記第1の励起状態から、よりエネルギー準位の高い第2の励起状態へ遷移させる波長 λ_2 の第2の光を発生させる第2の光源と、

上記第1の光および第2の光を上記試料に集光させる集光光学系と、

上記分子からの発光を検出する発光検出器とを有し、

上記第1の光源から上記第1の光としてマルチ空間モードの集光パターンが形成される光を発生させ、上記集光光学系により上記第1の光の集光パターンの一部領域のみが上記第2の光の集光パターンと空間的に重ね合わされるように上記試料に集光させるよう構成したことを特徴とする顕微鏡。

【請求項3】 上記第1の光源および第2の光源がコヒーレント光源であることを特徴とする請求項2に記載の顕微鏡。

【請求項4】 上記波長 λ_1 の第1の光の波面に位相分布をもたせる位相分布発生素子を有することを特徴とする請求項3に記載の顕微鏡。

【請求項5】 上記位相分布発生素子は、波面がゼロまたは π の位相差をもつ複数の分割された領域を有することを特徴とする請求項4に記載の顕微鏡。

【請求項6】 上記分割された領域は、隣接する領域と π の位相差をもつことを特徴とする請求項5に記載の顕微鏡。

【請求項7】 上記第2の光も、マルチ空間モードの集光パターンを有することを特徴とする請求項2から6のいずれか一つに記載の顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、光学装置および顕微鏡に関するもので、より詳しくは、異なる2波長の光を用いる超解像の蛍光顕微鏡のような顕微分光装置にお

いて、2波長の光の波面を操作して試料面に集光させることにより、検出感度および空間分解能の向上を図った顕微分光装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】光学顕微鏡の技術は古く、種々のタイプの顕微鏡が開発されてきた。また、近年では、レーザー技術および電子画像技術をはじめとする周辺技術の進歩により、更に高機能の顕微鏡システムが開発されている。

【0003】このような背景の中、例えば特開平8-184552号公報において、複数波長の光で試料を照明することにより発する二重共鳴吸収過程を用いて、得られる画像のコントラストの制御のみならず化学分析も可能にした高機能な顕微鏡が提案されている。

【0004】この顕微鏡は、二重共鳴吸収を用いて特定の分子を選択し、特定の光学遷移に起因する吸収および蛍光を観測するもので、その原理を図9～図17を参照して説明する。図9は、試料を構成する分子の価電子軌道の電子構造を示すもので、先ず、図9に示す基底(S0)の分子がもつ価電子軌道の電子を光により励起して図10に示す第1励起状態(S1状態)とする。次に、別な波長の光により同様に励起して図11に示す第2励起状態(S2状態)とする。この励起状態により、分子は蛍光あるいは燐光を発光したりして、図12に示すように基底状態に戻る。

【0005】二重共鳴吸収過程を用いた顕微鏡法では、図10の吸収過程や図11の蛍光や燐光の発光を用いて、吸収像や発光像を観察する。この顕微鏡法では、まず最初にレーザー光等により共鳴波長 λ_1 の光で図10のように試料を構成する分子をS1状態に励起させるが、この際、単位体積内でのS1状態の分子数は、照射する光の強度が増加するに従って増加する。

【0006】ここで、線吸収係数は、分子一個当りの吸収断面積と単位体積当たりの分子数との積で与えられるので、図11のような励起過程においては、続いて照射する共鳴波長 λ_2 に対する線吸収係数は、最初に照射した波長 λ_1 の光の強度に依存することになる。すなわち、波長 λ_2 に対する線吸収係数は、波長 λ_1 の光の強度で制御できることになる。このことは、波長 λ_1 および波長 λ_2 の2波長の光で試料を照射し、波長 λ_2 による透過像を撮影すれば、透過像のコントラストは波長 λ_1 の光で完全に制御できることを示している。

【0007】また、図11の励起状態での蛍光または燐光による脱励起過程が可能である場合には、その発光強度はS1状態にある分子数に比例する。したがって、蛍光顕微鏡として利用する場合にも画像コントラストの制御が可能となる。

【0008】さらに、二重共鳴吸収過程を用いた顕微鏡法では、上記の画像コントラストの制御のみならず、化学分析も可能にする。すなわち、図9に示される最外殻

価電子軌道は、各々の分子に固有なエネルギー準位を持つので、波長 λ_1 は分子によって異なることになり、同時に、波長 λ_2 も分子固有のものとなる。

【0009】ここで、従来の単一波長で照明する場合でも、ある程度特定の分子の吸収像あるいは蛍光像を観察することが可能であるが、一般にはいくつかの分子の吸収帯の波長領域は重複するので、試料の化学組成の正確な同定までは不可能である。

【0010】これに対し、二重共鳴吸収過程を用いた顕微鏡法では、波長 λ_1 および波長 λ_2 の2波長により吸収あるいは発光する分子を限定するので、従来法よりも正確な試料の化学組成の同定が可能となる。また、価電子を励起する場合、分子軸に対して特定の電場ベクトルをもつ光のみが強く吸収されるので、波長 λ_1 および波長 λ_2 の偏光方向を決めて吸収または蛍光像を撮影すれば、同じ分子でも配向方向の同定まで可能となる。

【0011】また、最近では、例えば特開平10-142151号公報に開示されているように、二重共鳴吸収過程を用いて回折限界を越える高い空間分解能をもつ蛍光顕微鏡も提案されている。図13は、やはり分子における二重共鳴吸収過程の概念図で、基底状態 S_0 の分子が、波長 λ_1 の光で第1励起状態である S_1 に励起され、更に波長 λ_2 の光で第2励起状態である S_2 に励起されている様子を示していると共に、 S_2 からの蛍光が極めて弱い場合を示している。

【0012】図13に示すような光学的性質を持つ分子の場合には、極めて興味深い現象が起きる。図14は、図13と同じく二重共鳴吸収過程の概念図で、横軸のX軸は空間的距離の広がりを表わし、波長 λ_2 の光を照射した空間領域A1と波長 λ_2 の光が照射されない空間領域A0とを示している。

【0013】図14において、空間領域A0では波長 λ_1 の光の励起により S_1 状態の分子が多数生成され、その際に空間領域A0からは波長 λ_3 で発光する蛍光が見られる。しかし、空間領域A1では、波長 λ_2 の光を照射したため、 S_1 状態の分子のほとんどが即座に高位の S_2 状態に励起されて、 S_1 状態の分子は存在しなくなる。このような現象は、幾つかの分子により確認されている。これにより、波長 λ_3 の蛍光は完全になくなり、しかも、 S_2 状態からの蛍光はもともとないので、A1領域では蛍光自体が完全に抑制されることになる。したがって、空間領域で蛍光があるのは、A0領域のみとなる。

【0014】この結果は、顕微鏡の応用分野から考察すると、極めて重要な意味をもつものである。すなわち、従来の走査型レーザー顕微鏡等では、レーザー光を集光レンズによりマイクロビームに集光して観察試料上を走査するが、その際のマイクロビームのサイズは、集光レンズの開口数と波長とで決まる回折限界となり、原理的にそれ以上の空間分解能は期待できない。

【0015】ところが、図14の場合には、波長 λ_1 と λ_2 との2種類の光を空間的に上手く重ね合わせて、波長 λ_2 の光の照射により蛍光領域を抑制することで、例えば波長 λ_1 の光の照射領域に着目すると、蛍光領域が集光レンズの開口数と波長とで決まる回折限界よりも狭くでき、実質的に空間分解能を向上させることが可能となる。したがって、この原理を利用することで、回折限界を越える二重共鳴吸収過程を用いた超解像顕微鏡、例えば蛍光顕微鏡が可能となる。

【0016】さらに、本発明者は、顕微鏡の超解像性を高めるための新たな工夫も既に提案している。すなわち、超解像顕微鏡の機能を十分に活かすための蛍光ラベラー分子や、利用する波長 λ_1 および λ_2 の2つの光の試料への照射タイミング等の提案である。この提案では、少なくとも基底状態を含め3つの量子状態を有していて、第1励起状態をのぞく高位のエネルギー状態から基底状態へ脱励起するときの遷移が蛍光による緩和過程よりも熱緩和過程が支配的である各種分子が染色する蛍光プローブ分子と、生化学的な染色技術を施した生体分子とを化学結合させた試料を、染色する分子を波長 λ_1 の光で S_1 状態に励起し、続いて波長 λ_2 の光により即座に高位の量子準位に励起することで、 S_1 状態からの蛍光を抑制するものである。このように、分子の光学的性質を利用し、空間的な蛍光領域を人為的に抑制することで、空間分解能の向上をはかるものである。

【0017】このような分子の光学的性質は、量子化学的な立場から説明することができる。すなわち、一般に、分子はそれを構成する各原子が σ または π 結合によって結ばれている。言い換えると、分子の分子軌道は、 σ 分子軌道または π 分子軌道を有していて、これらの分子軌道に存在する電子が各原子を結合する重要な役割を担っている。そのうちでも、 σ 分子軌道の電子は各原子を強く結合し、分子の骨格である分子内の原子間距離を決めている。それに対して、 π 分子軌道の電子は各原子の結合にほとんど寄与しないで、むしろ分子全体に極めて弱い力で束縛されている。

【0018】多くの場合、 σ 分子軌道にいる電子を光で励起すると、分子の原子間隔が大きく変化し、分子の解離を含む大きな構造変化が起こる。その結果として、原子の運動エネルギーや、構造変化のために光が分子に与えたエネルギーのほとんどが熱エネルギーに変化する。したがって、励起エネルギーは蛍光という光の形態では消費されない。また、分子の構造変化は極めて高速（psより短い）に起こるので、その過程で仮に蛍光が起きてもその寿命が極めて短い。

【0019】これに対し、 π 分子軌道の電子は、励起しても分子の構造自体はほとんど変化せず、高位の量子的な離散順位に長時間とどまり、nsecのオーダーで蛍光を放出して脱励起する性質を有している。

【0020】量子化学によれば、分子が π 分子軌道をも

つことと、二重結合をもつこととは同等であり、用いる蛍光ラベラー分子には、二重結合を豊富にもつ分子を選定することが必要条件となる。このことは、二重結合をもつ分子でもベンゼンやピラジン等の6員環分子においては、S2励起状態からの蛍光が極めて弱いことが確かめられている（例えば、M.Fujii et.al.Chem.Phys.Lett.171(1990)341）。

【0021】したがって、ベンゼンやピラジン等の6員環分子を含む分子を蛍光ラベラー分子として選定すれば、S1状態からの蛍光寿命が長く、しかも光励起によりS1状態からS2状態に励起することで、分子からの蛍光を容易に抑制できるので、超解像性を効果的に利用することができる。すなわち、これら蛍光ラベラー分子により染色して観察を行えば、高空間分解能で試料の蛍光像を観察することができるのみならず、その分子の側鎖の化学基を調整することにより、生体試料の特定の化学組織のみ選択的に染色できるので、試料の詳細な化学組成までも分析可能となる。

【0022】また、一般に、2重共鳴吸収過程は2つ光の波長や偏光状態等が特定の条件を満たすときにのみ起こるので、これを用いることで分子の構造を非常に詳細に知ることができる。すなわち、光の偏光方向と分子の配向方向とは強い相関関係があり、2つ波長の光のそれぞれの偏光方向と分子の配向方向とが特定の角度をなすとき、2重共鳴吸収過程が強く起こる。したがって、2つ波長の光を試料に同時に照射して、それぞれの光りの偏光方向を回転することにより、蛍光の消失の程度が変化するので、その様子から観測しようとする組織の空間配向の情報も得ることができる。このことは、2つ波長の光を調整することでも可能である。

【0023】以上のように、本発明者による先の提案によると、超解像性以外にも、高い分析能力を有していることがわかる。さらに、波長 λ_1 と λ_2 との2つの光の照射タイミングを工夫することで、S/Nを改善し、かつ蛍光抑制を効果的に起こすことができ、超解像性をより効果的に発現することが可能となる。

【0024】図15は、上述した本発明者の先の提案に係る超解像顕微鏡の一例の構成を示すものである。この超解像顕微鏡では、Nd:YAGレーザー51からのレーザー光をハーフミラー52で2分し、その一方を3倍波発生器53を経てダイクロイックミラー54に入射させ、他方をミラー55、ラマンシフタ56、ミラー57および位相板58を経てダイクロイックミラー54に入射させて、3倍波発生器53からのレーザー光と、位相板58を透過したレーザー光とをダイクロイックミラー54で空間的に重ね合わせ、その重ね合わせたレーザー光を、コンデンサレンズ59、ピンホール60、ダイクロイックミラー61および対物レンズ62を経て、移動ステージ63上でカバーガラス64により保持された試料65に集光させている。なお、位相板58は、図16

に示すように、光軸に対して点対称な位置で位相差 π を与えるように形成されており、試料65は、予め蛍光ラベラー分子で染色されている。

【0025】また、試料65から発する蛍光は、対物レンズ62を経てダイクロイックミラー61により往路と分離し、ピンホール66、シャープカットフィルタ67、バンドパスフィルタ68およびノッチフィルタ69を経てフォトマル70で受光している。なお、シャープカットフィルタ67、バンドパスフィルタ68、ノッチフィルタ69およびフォトマル70は、遮光ボックス71に収容し、この遮光ボックス71にピンホール66を形成している。

【0026】図15に示す超解像顕微鏡は、3倍波発生器53からのレーザー光を、蛍光ラベラー分子をS0状態からS1状態へ励起するポンプ光とし、ラマンシフタ56からのレーザー光をS1状態からS2状態へ励起するイレース光として、このイレース光を位相板58で中空ビーム化してダイクロイックミラー54でポンプ光と空間的に重ね合わせ、これにより試料65上でイレース光の強度がゼロとなる光軸近傍以外の蛍光を抑制して、結果的にポンプ光の広がりより狭い領域に存在する蛍光ラベラー分子のみを超解像で観察するものである。

【0027】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、本発明者による種々の実験検討によると、上述した各種の超解像顕微鏡には、結像性能の点で更に改良すべき点があることが判明した。例えば、図15に示した超解像顕微鏡では、イレース光を図16に示した位相板58を通すことにより中空ビーム化してポンプ光と空間的に重ね合わせ、これにより試料65上でイレース光の強度がゼロとなる光軸近傍以外の蛍光を抑制するので、理論上は非常にエレガントな方法であるが、実際には、イレース光の中央部の強度を完全にゼロにするのは困難である。

【0028】その理由は、位相板58を設計値通りに理想的に加工することができないために、ビーム光軸に対して点対称な位置で位相差 π を与えることができず、電場強度を完全には相殺できないためである。このため、ビーム光軸に対して点対称な位置にある光波のうち、相殺されない分が光軸上に残留し、しかもビーム光軸を中心とする全方位角 2π の成分の光波に対して相殺されない残留分が光軸上に堆積し、結果として図17に示すように、ビーム光軸中央でも無視できない電場強度が発生することになる。

【0029】したがって、このような状態で、ポンプ光とイレース光とを試料面で重複させ、蛍光抑制現象を利用して超解像性を発現させようとしても、ポンプ光中心部での蛍光強度が低下し、結果として超解像性が弱くなり、むしろ蛍光信号の全体量の低下による弊害が目立つようになる。

【0030】本発明は、かかる点に鑑みてなされたもの

で、簡単な構成で、結像性能の良好な超解像性を容易に発現できる光学装置および顕微鏡を提供することを目的とするものである。

【0031】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成する請求項1に係る光学装置の発明は、波長の異なる複数の光を発生する光源手段と、上記複数の光を対象に集光する集光手段と、上記対象から発せられる光を検出する発光検出手段とを有し、上記光源手段から発生する波長の異なる複数の光のうち、少なくとも1つの光はマルチ空間モードの集光パターンが形成される光として、これら複数の光を上記集光手段により上記マルチ空間モードの集光パターンの一部領域のみが他の光の集光パターンと空間的に重ね合わされるように上記対象に集光させるよう構成したことを特徴とするものである。

【0032】請求項2に係る顕微鏡の発明は、少なくとも基底状態を含め3つの電子状態を有する分子で染色した試料を観察する顕微鏡であって、上記分子を基底状態から第1の励起状態へ遷移させる波長 λ_1 の第1の光を発生する第1の光源と、上記分子を上記第1の励起状態から、よりエネルギー準位の高い第2の励起状態へ遷移させる波長 λ_2 の第2の光を発生させる第2の光源と、上記第1の光および第2の光を上記試料に集光させる集光光学系と、上記分子からの発光を検出する発光検出器とを有し、上記第1の光源から上記第1の光としてマルチ空間モードの集光パターンが形成される光を発生させ、上記集光光学系により上記第1の光の集光パターンの一部領域のみが上記第2の光の集光パターンと空間的に重ね合わされるように上記試料に集光させるよう構成したことを特徴とするものである。

【0033】請求項3に係る発明は、請求項2に記載の顕微鏡において、上記第1の光源および第2の光源がコヒーレント光源であることを特徴とするものである。

【0034】請求項4に係る発明は、請求項3に記載の顕微鏡において、上記波長 λ_1 の第1の光の波面に位相分布をもたせる位相分布発生素子を有することを特徴とするものである。

【0035】請求項5に係る発明は、請求項4に記載の顕微鏡において、上記位相分布発生素子は、波面がゼロまたは π の位相差をもつ複数の分割された領域を有することを特徴とするものである。

【0036】請求項6に係る発明は、請求項5に記載の顕微鏡において、上記分割された領域は、隣接する領域と π の位相差をもつことを特徴とするものである。

【0037】請求項7に係る発明は、請求項2から6のいずれか一つに記載の顕微鏡において、上記第2の光も、マルチ空間モードの集光パターンを有することを特徴とするものである。

【0038】すなわち、本発明では、ポンプ光および/またはイレース光の集光ビームパターンをマルチモード

化して空間的に複数の区域に分割し、これらのビームを試料集光面上で空間的に一部重複させて、ポンプ光の1部の分割区域からの蛍光を抑制し、これによりポンプ光の回折限界のサイズよりも微小な空間領域からの蛍光信号の検出を可能にするものである。

【0039】一般に、レーザー光源のように波面が揃った光ビームを、2次元的な位相分布をもつ位相フィルタに通すと、任意の空間モードを持った集光ビームが形成される。これは、光情報技術の分野では既に実用化されている技術である（例えば、T.M.Turpin et.al.Roc.SP
IE,3073(1997)178-184）。

【0040】例えば、図1に示すように、ポンプ光を集光ビーム内をマルチモード化して2つに分割する。同様に、イレース光も2つに分割する。この二つのビームを、1分割領域のみを重ね合わせると、その部分からの蛍光は完全に抑制され、分解能を倍に向上したことになる。

【0041】また、この他にも図2に示すように3分割する方法もあり、高次のモードを生成するに従い空間分解能も向上する。さらに、図3に示すように2次元的な高次の空間モードもつポンプ光を形成し、イレース光の空間パターンは輪帯状にして、空間分割されたポンプ光の1分割領域を残し、それ以外の領域をイレース光の照射領域と重複させて蛍光を消去する方法も可能である。

【0042】このように、ポンプ光またはイレース光の集光ビームパターンをマルチモード化して空間的に複数の区域に分割することは、既存技術を用いることで複数の方法が可能であり、基本的には、波面の揃ったコヒーレント光を用いて、波面走査することにより行なうことができる。

【0043】その一つは、位相板を用いる方法で、図1～図3に示したように、レーザー光の波面を光軸と直交する平面内で位相差が0か π 異なる領域を適当に配置してやればよい。また、ポンプ光を2分割する場合には、瞳面を左右半分の2領域に分けて、ポンプ光またはイレース光の位相差が互いに π 異なるようにすればよい。このようにしてビームを集光すれば、2領域の境界面で電場強度の符号が反転して、結果として電場がゼロとなり、集光ビームは2つのピークをもつ形状になる。同様に、瞳面を3領域に分け、隣接する領域の位相差が互いに π 異なるようにすれば、図2に示したように、集光ビームは3つのピークをもつ形状になる。

【0044】なお、上記の位相差を与えるには、光学研磨されたガラス基板の上に、例えばフッ化マグネシウムのような高屈折率の光学薄膜を蒸着したり、直接、ガラス基板をケミカルエッチングする等の方法により可能である。その他、光源であるレーザ自体が、空間的にマルチモード化したビームを発生するものを用いることでも可能である。すなわち、レーザー共振器の境界条件を選ぶことにより、ビーム断面で縦が n 、横が m の $n \times m$ の

複数のピークを持つモードパターンの光を発振させることができる。これは、いわゆるTEMモードと呼ばれるもので、図4(a)、(b)および(c)に代表的な低次のTEMモードの三つのパターンを示す(オーム社:新世代工学シリーズ「レーザー工学」1999年、中井貞雄著)。このように、レーザー自身が空間的にマルチモード化したビームを発振する場合には、位相板を用いることなく超解像を実現することができるので、簡潔な顕微鏡システムの構成が可能となる。

【0045】

【発明の実施の形態】以下、本発明の一実施の形態について、図5～図8を参照して説明する。図5は顕微鏡の一例の構成を示す図である。本実施の形態では、蛍光色素ローダミン6Gで染色した生物試料1を観察する。ロ*

ローダミン6Gの各エネルギー準位間で遷移が起こるときのおおよその吸収断面積

σ_0 (基底状態から第1電子励起状態へ遷移するときの断面積)	10^{-16}cm^2 (532nm) 1)
σ_1 (第1電子励起状態から第2電子励起状態へ遷移するときの断面積)	10^{-17}cm^2 (599nm) 1)
λ_f (蛍光強度最大値波長)	555nm 1)

1): B. Sahar et. al. IEEE. J. Quantum Electronics 13, 962 (1977)

【0047】図5において、Nd:YAGピコ秒レーザー2からの出射光は、ビームスプリッター3で2本のビームに分歧し、その一方のビームをKDP結晶4により2倍の波長532nmのビームに変換してポンプ光とし、他方のビームはミラー5で反射させた後、酸化バリウム結晶Ba(NO₃)₂からなるラマンシフタ6により波長599nmのビームに変換してイレース光とする。

【0048】KDP結晶4から出射されるポンプ光は、位相板7を通過させることにより、1×2で空間的にマルチモード化してダイクロイックミラー8に入射させる。位相板7は、図7に示すように、光学研磨した石英ガラス基板をケミカルエッチングし、そのエッチング深さにより波長532nmのポンプ光に対して隣接する2領域で π だけの位相差を与えるように構成して、ポンプ光を空間的にマルチモード化したビームに変形する。

【0049】同様に、ラマンシフタ6から出射されるイレース光も、位相板9を通過させることにより1×2で空間的にマルチモード化し、そのイレース光をミラー10を経てダイクロイックミラー8に入射させる。位相板9は、図8に示すように、位相板7と同様、光学研磨した石英ガラス基板をケミカルエッチングし、そのエッチング深さを波長599nmのイレース光に調整することにより、イレース光を空間的にマルチモード化したビームに変形する。

【0050】ダイクロイックミラー8では、ポンプ光とイレース光とをコンバインし、そのコンバインしたビームをリレーレンズ11およびハーフミラー12を経て対物レンズ13により、サンプルステージ14に載置され

*ローダミン6Gは、図6および表1に示す光学特性を有するので、光源2としては、レーザー媒体がNd:YAGからなり、30ps程度のパルス幅のレーザー光(基本波長:1064nm)を出射するNd:YAGピコ秒レーザーを用い、このレーザー光を倍波した波長532nmの光をポンプ光として用い、ラマン結晶で波長変換した2次のストークス光に対応する波長599nmの光をイレース光として用いる。本実施の形態では、ポンプ光およびイレース光をそれぞれ2分割した1×2の空間モードとして、図1に示したように、試料1上でポンプ光とイレース光とを一部空間的にオーバーラップさせて集光させる。

【0046】

【表1】

た試料1上に集光させる。

【0051】ここで、試料1上に集光されるポンプ光およびイレース光は、図1に示した位置関係となり、1×2で空間的にマルチモード化されたポンプ光の半分が、イレース光と空間的に重複し、その重複部分は蛍光が抑制される。このポンプ光とイレース光との空間的な重ね合わせは、ダイクロイックミラー8、ミラー10およびハーフミラー12により調整することができる。

【0052】一方、試料1から発する蛍光は、対物レンズ13、ハーフミラー12およびハーフミラー15を透過させて、結像レンズ16によりCCDカメラ17の撮像面上に結像させ、これにより蛍光像を目視できるようにする。

【0053】また、ハーフミラー15で一部反射される蛍光は、レンズ18により空間フィルタであるピンホール19に結像させ、このピンホール19を通過した蛍光をレンズ20および透過型回折格子21を経てICCDカメラ22の撮像面上に結像させる。

【0054】ここで、ICCDカメラ22は、光-電子変換膜と2次元光電子増倍管からなり、蛍光は透過型回折格子21を経て蛍光スペクトルの形としてICCDカメラ22で撮影される。したがって、試料1をサンプルステージ14により2次元走査しながら蛍光信号を計測し、各点におけるデータをパーソナルコンピュータ等のメモリに格納してCRT等のモニタ上に表示させれば、目的とする試料1の構造を画像化することができる。

【0055】本実施の形態の顕微鏡によれば、試料1に集光したレーザー光よりも遥かに微小な領域の蛍光信号

をセレクトすることができるので、計測法としてのポテンシャルを極めて高くすることができる。また、サンプルステージ14として、ピエゾ素子で駆動するものを用いれば、位置分解能を10nm程度と極めて高くできるので、超解像顕微鏡の空間分解能に十分見合った性能を持たせることができる。

【0056】さらに、本実施の形態の顕微鏡では、ピンホール19を顕微鏡光学系の共焦点に配置しているので、試料1の3次元観察も可能である。すなわち、ピンホール19は、レーザー光の焦点位置から発する蛍光のみを通過させることができるので、サンプルステージ14を光軸方向に移動させて、レーザー光に対して2次元走査すれば、光学深さ方向における試料1の断層像を得ることができる。

【0057】また、上記実施の形態では、一つのNd:YAGピコ秒レーザー2の出射光からポンプ光およびイレース光を得るようにしたが、ポンプ光およびイレース光を別々の光源から得るように構成することもできる。

【0058】

【発明の効果】以上のように、本発明によれば、波長の異なる複数の光のうち、少なくとも1つの光はマルチ空間モードの集光パターンが形成される光として、これら複数の光をマルチ空間モードの集光パターンの一部領域のみが他の光の集光パターンと空間的に重ね合わされるように対象に集光させるようにしたので、簡単な構成で、結像性能の良好な超解像性を容易に発現できる光学装置および顕微鏡を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の原理を説明するための図である。

【図2】 同じく、本発明の原理を説明するための図である。

【図3】 同じく、本発明の原理を説明するための図である。

【図4】 代表的な低次のTEMモードの三つのパターンを示す図である。

【図5】 本発明の一実施の形態による顕微鏡の構成を示す図である。

【図6】 図5に示す試料の光学特性を示す図である。

【図7】 図5において、ポンプ光をマルチモード化する位相板の構成および作用を説明するための図である。*40

*【図8】 同じく、図5において、イレース光をマルチモード化する位相板の構成および作用を説明するための図である。

【図9】 試料を構成する分子の価電子軌道の電子構造を示す概念図である。

【図10】 図9の分子の第1励起状態を示す概念図である。

【図11】 同じく、第2励起状態を示す概念図である。

10 【図12】 同じく、第2励起状態から基底状態に戻る状態を示す概念図である。

【図13】 分子における二重共鳴吸収過程を説明するための概念図である。

【図14】 同じく、二重共鳴吸収過程を説明するための概念図である。

【図15】 本発明者が先の提案した超解像顕微鏡の一例の構成を示す図である。

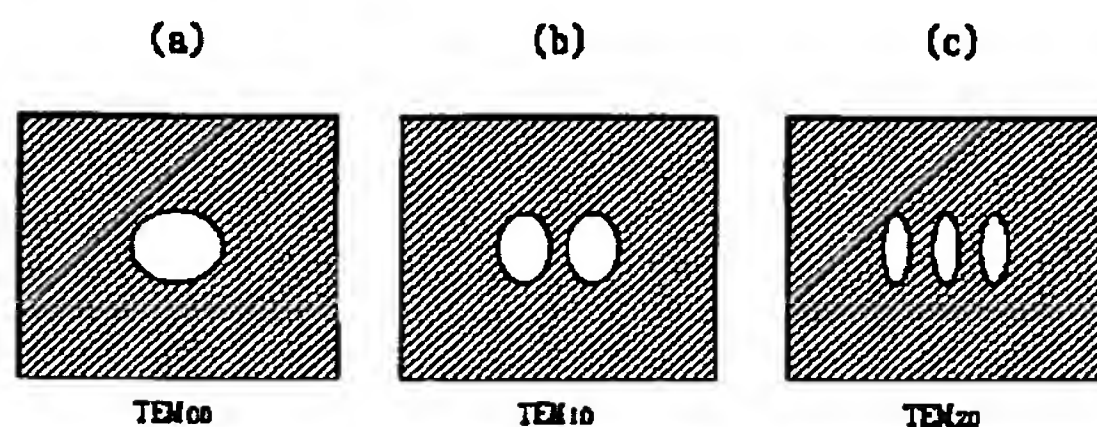
【図16】 図15に示す位相板の構成を示す平面図である。

20 【図17】 図15に示す超解像顕微鏡の改良点を説明するための図である。

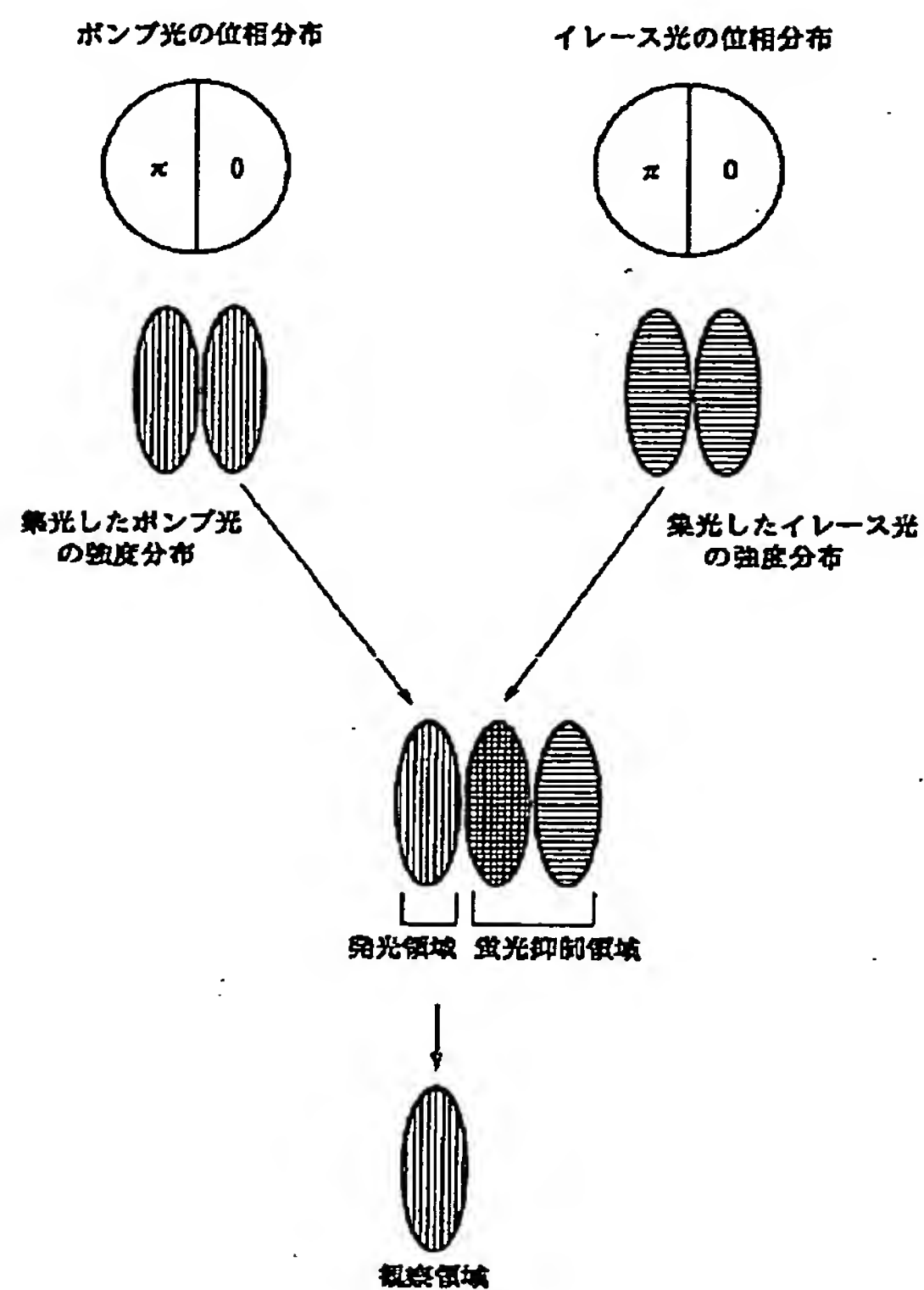
【符号の説明】

- 1 試料
- 2 Nd:YAGピコ秒レーザー
- 3 ビームスプリッター
- 4 KDP結晶
- 5, 10 ミラー
- 6 ラマンシフト
- 7, 9 位相板
- 8 ダイクロイックミラー
- 11 リレーレンズ
- 12, 15 ハーフミラー
- 13 対物レンズ
- 14 サンプルステージ
- 16 結像レンズ
- 17 CCDカメラ
- 18, 20 レンズ
- 19 ピンホール
- 21 透過型回折格子
- 22 ICCDカメラ

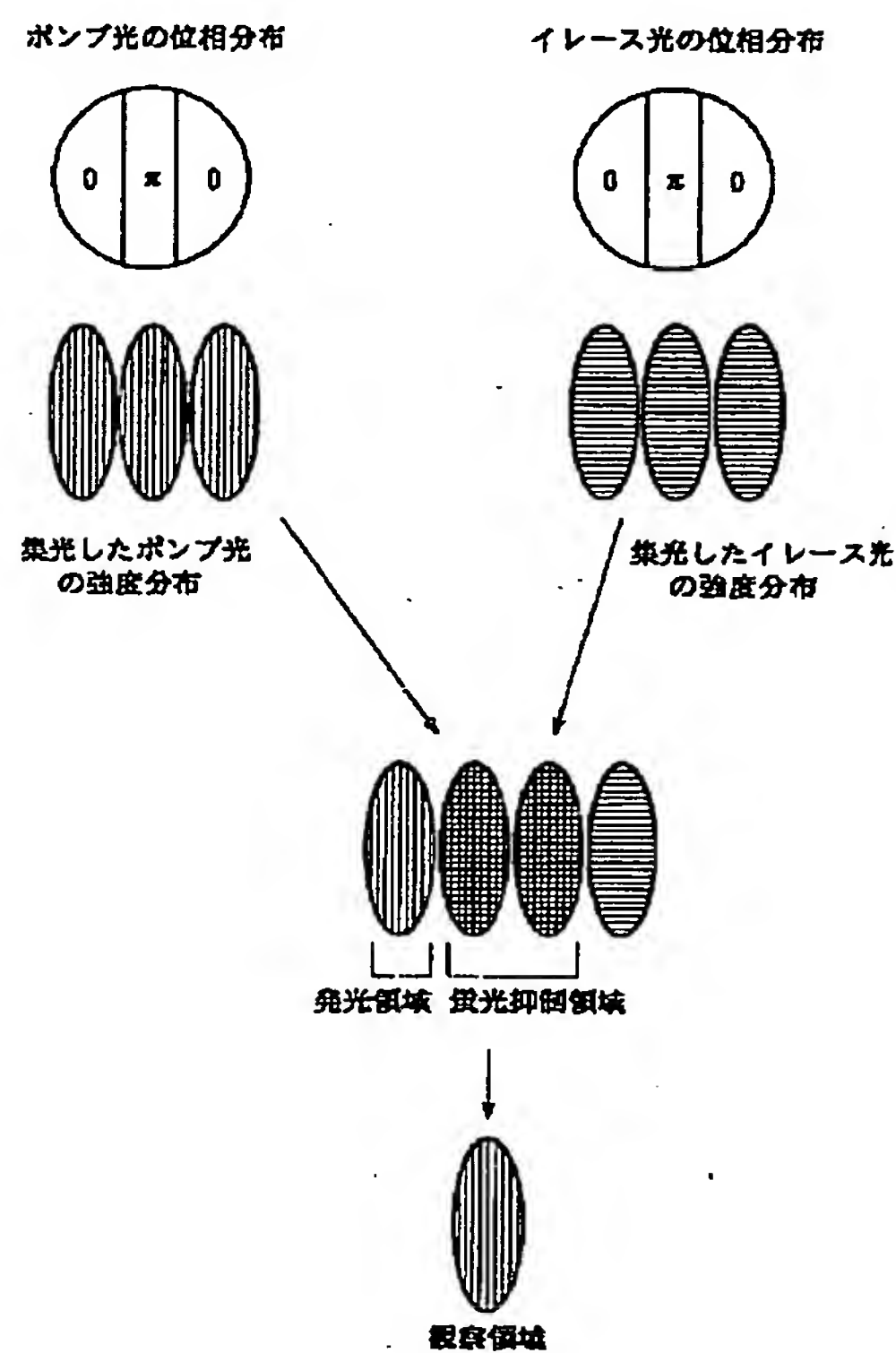
【図4】



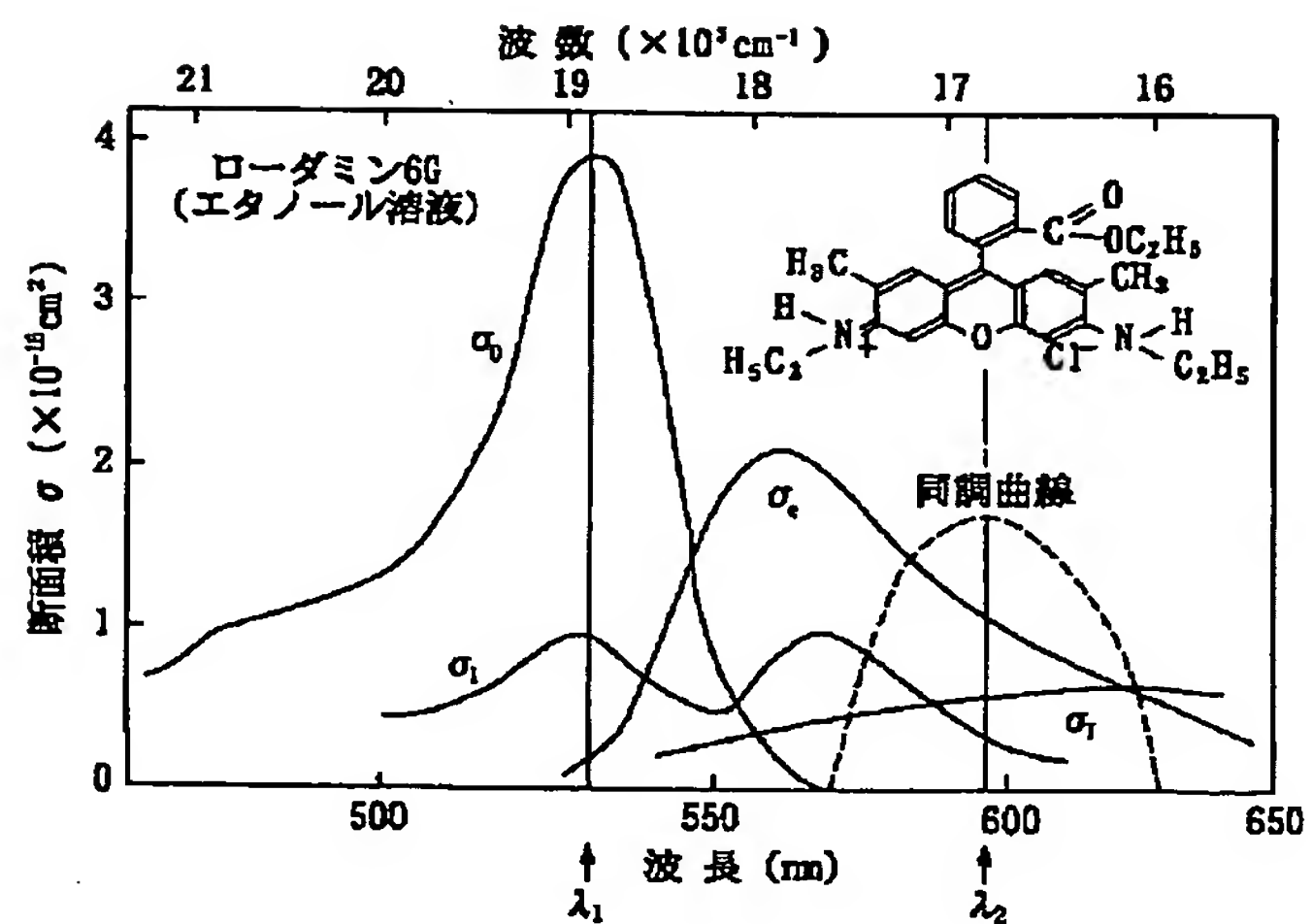
【図1】



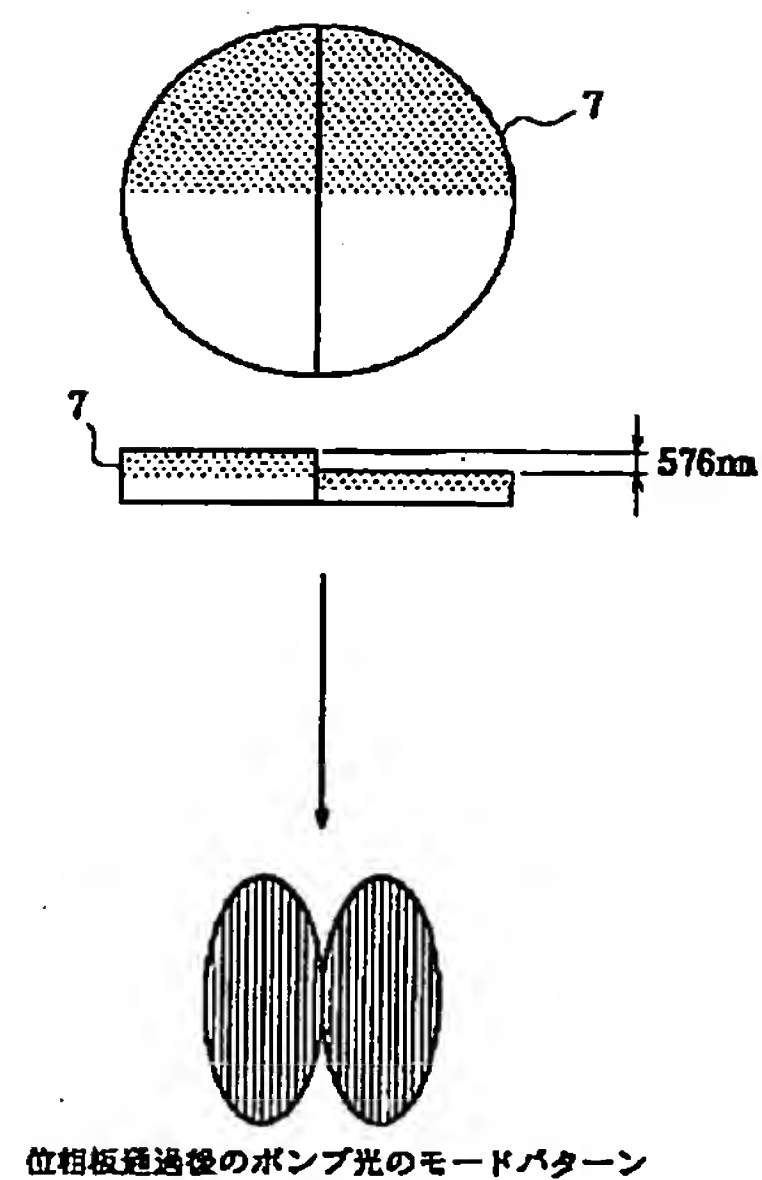
【図2】



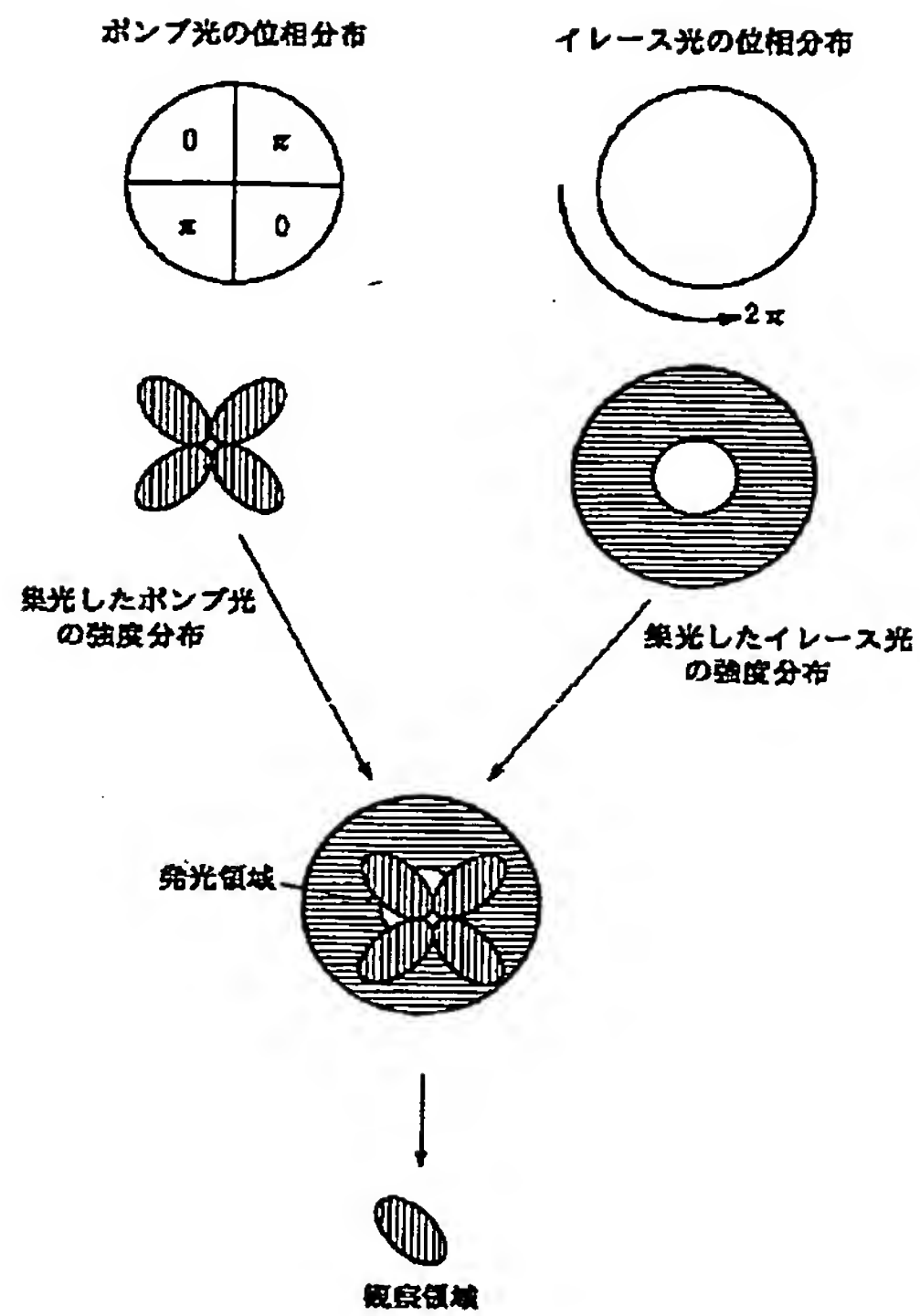
【図6】



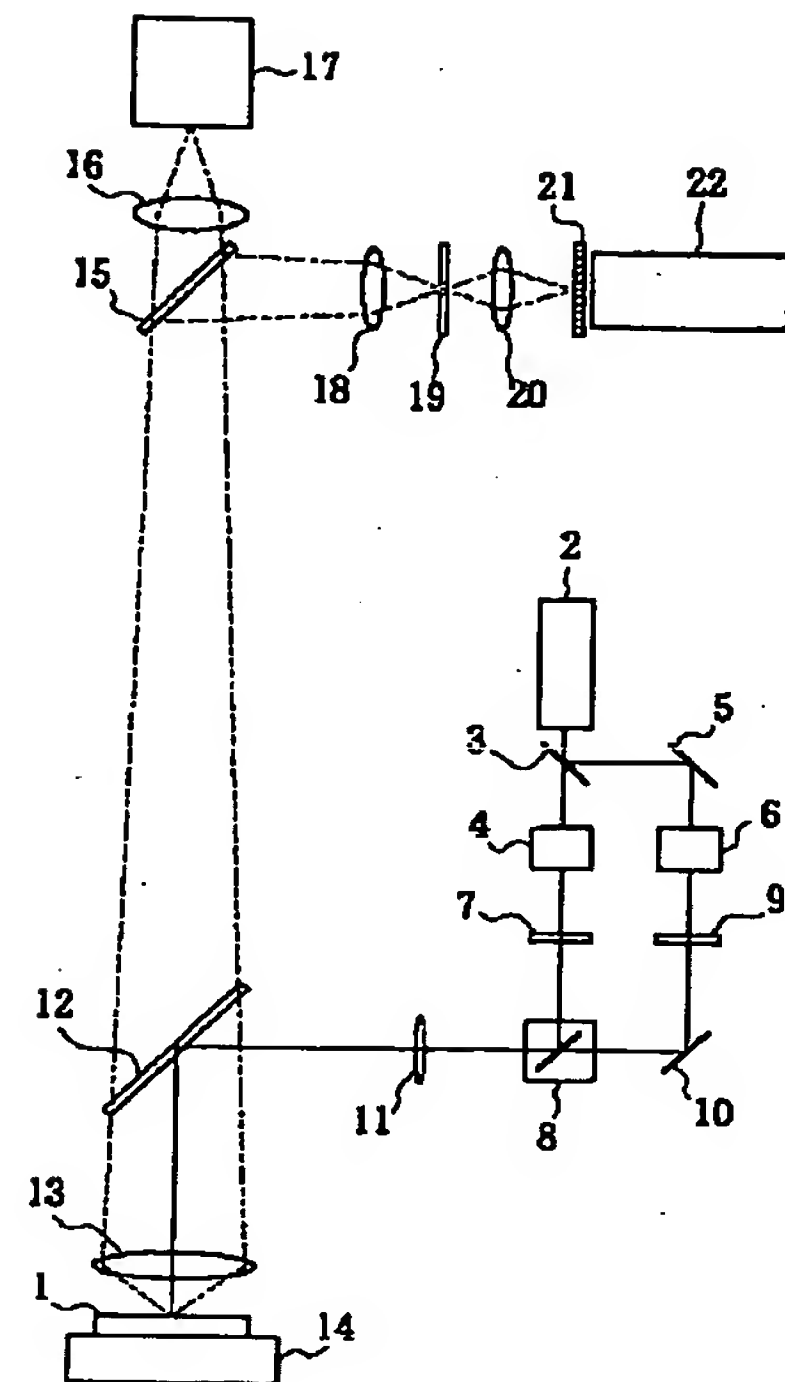
【図7】



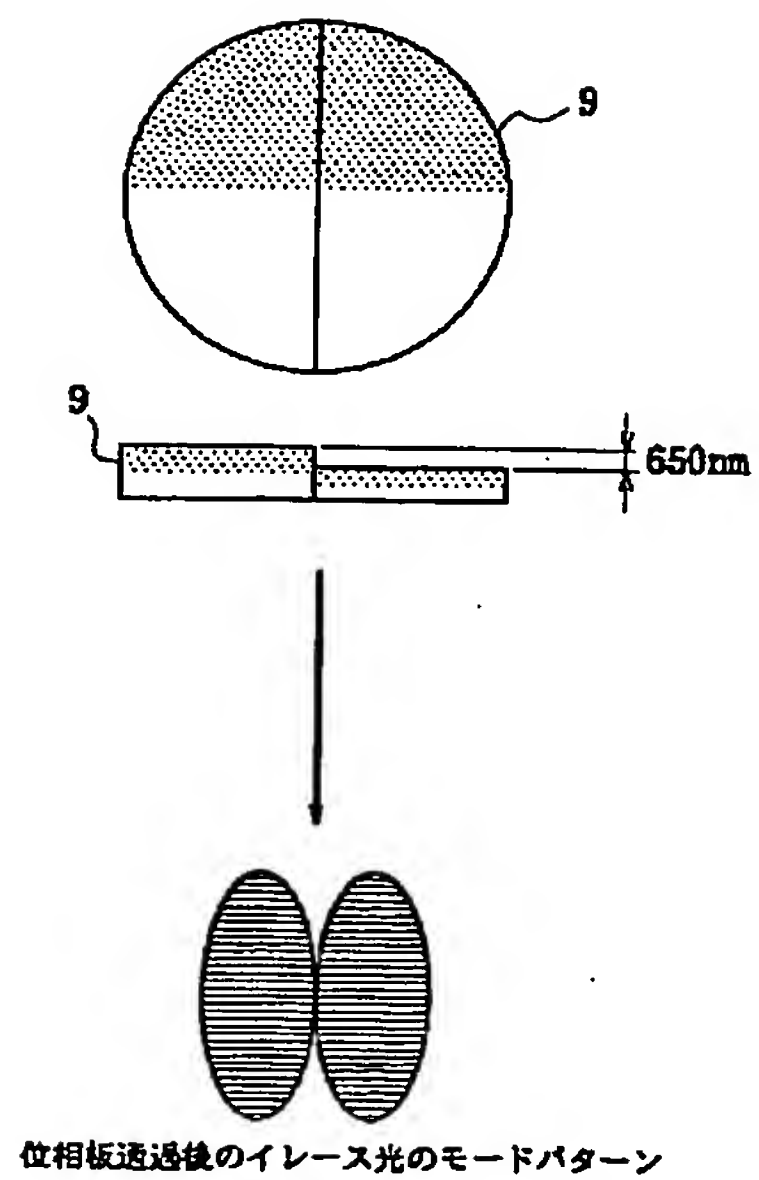
【図3】



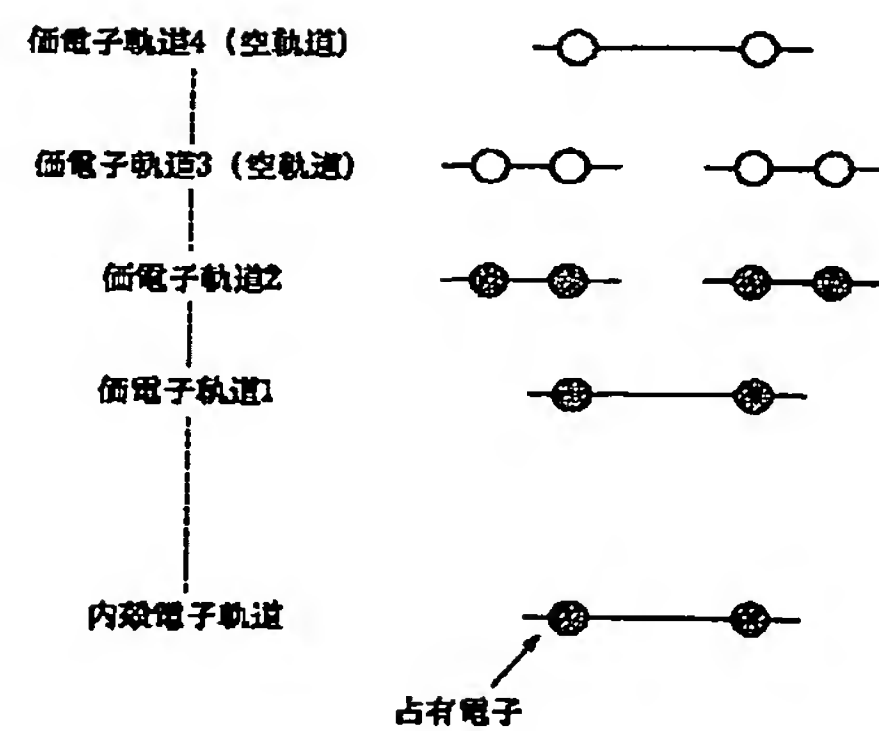
【図5】



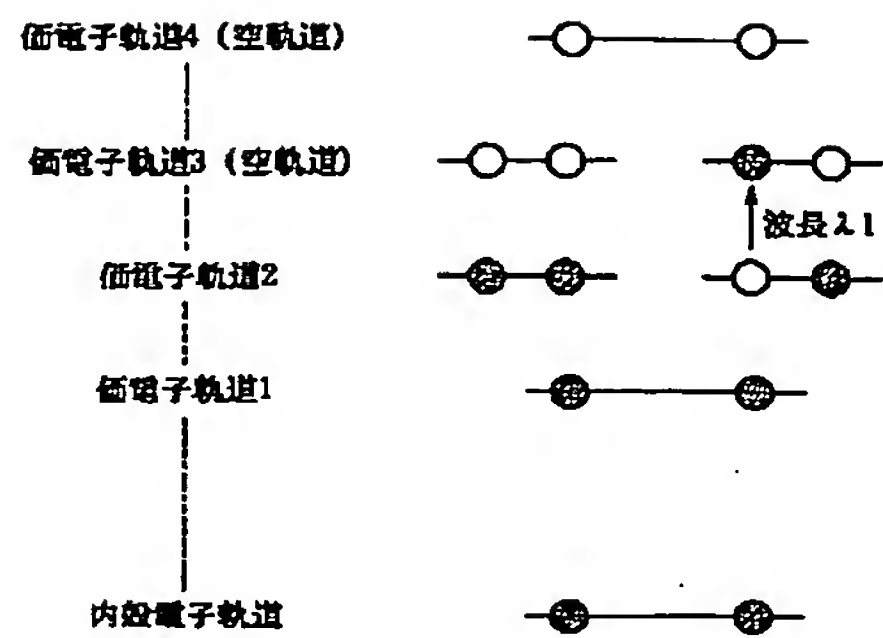
【図8】



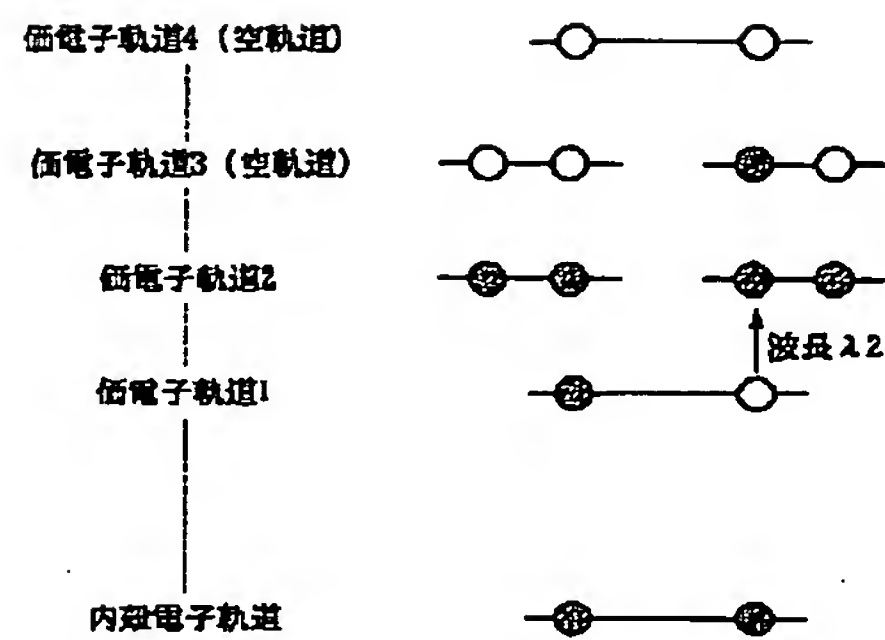
【図9】



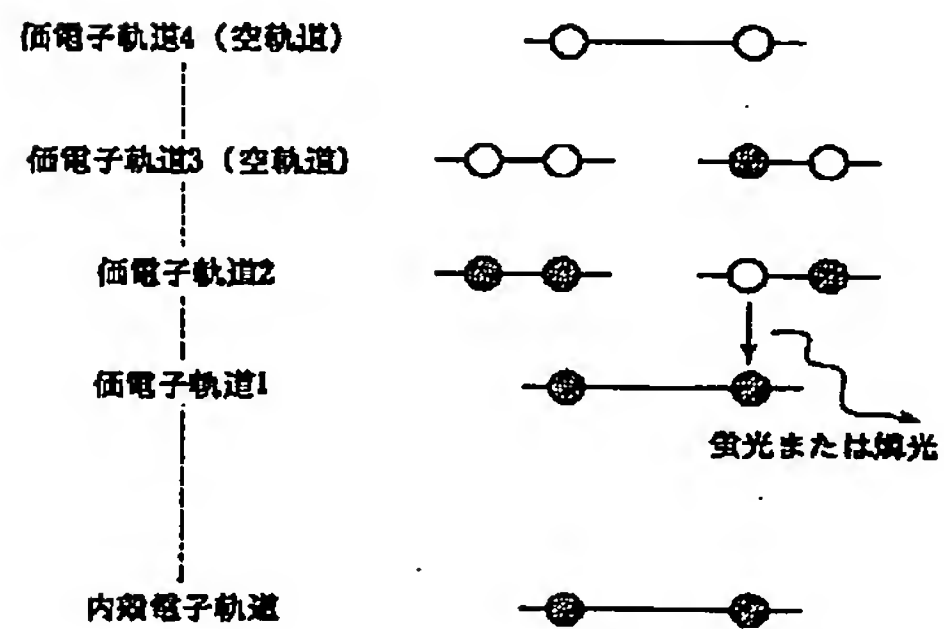
【図10】



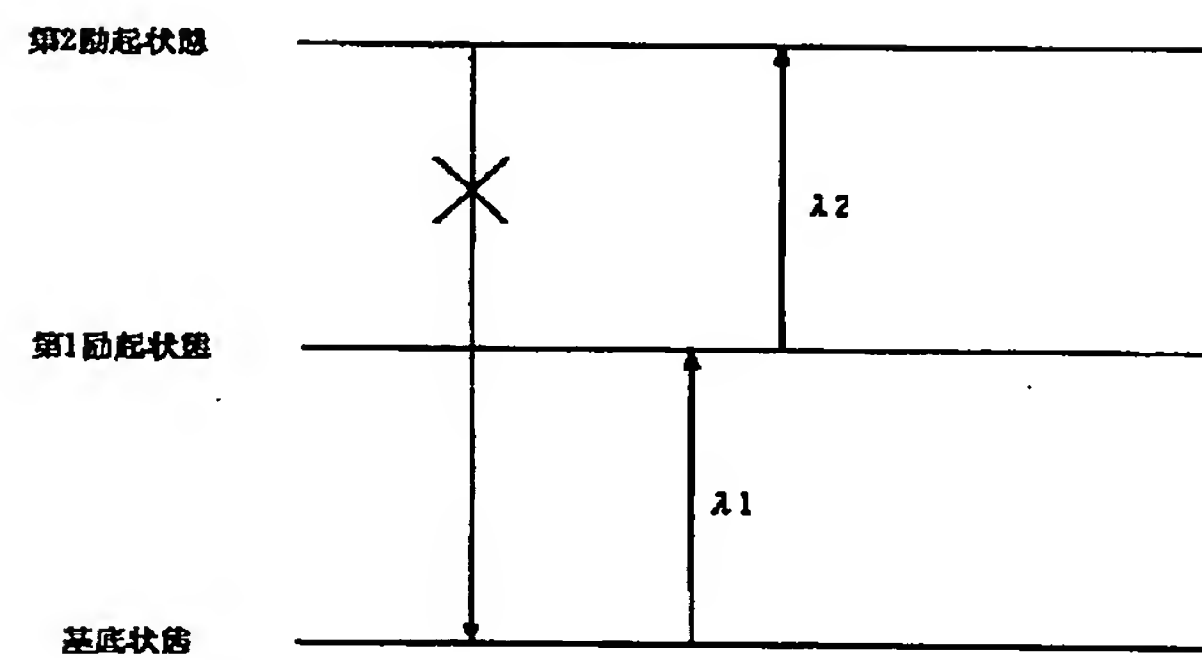
【図11】



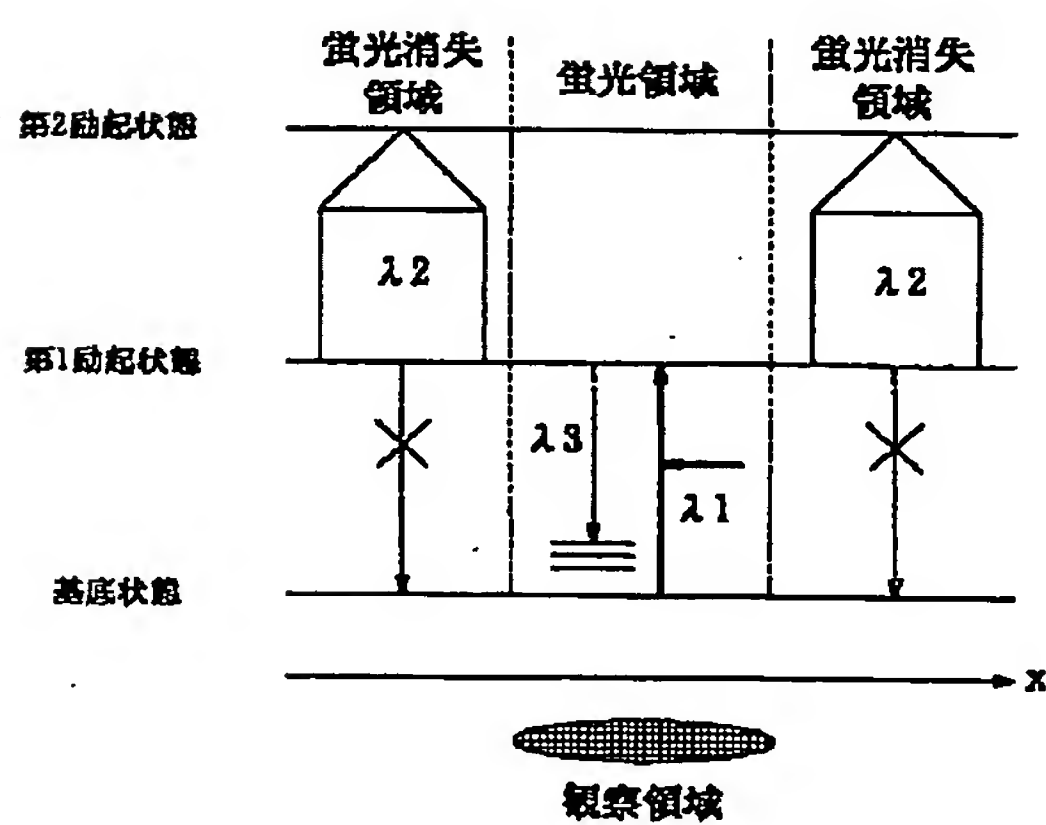
【図12】



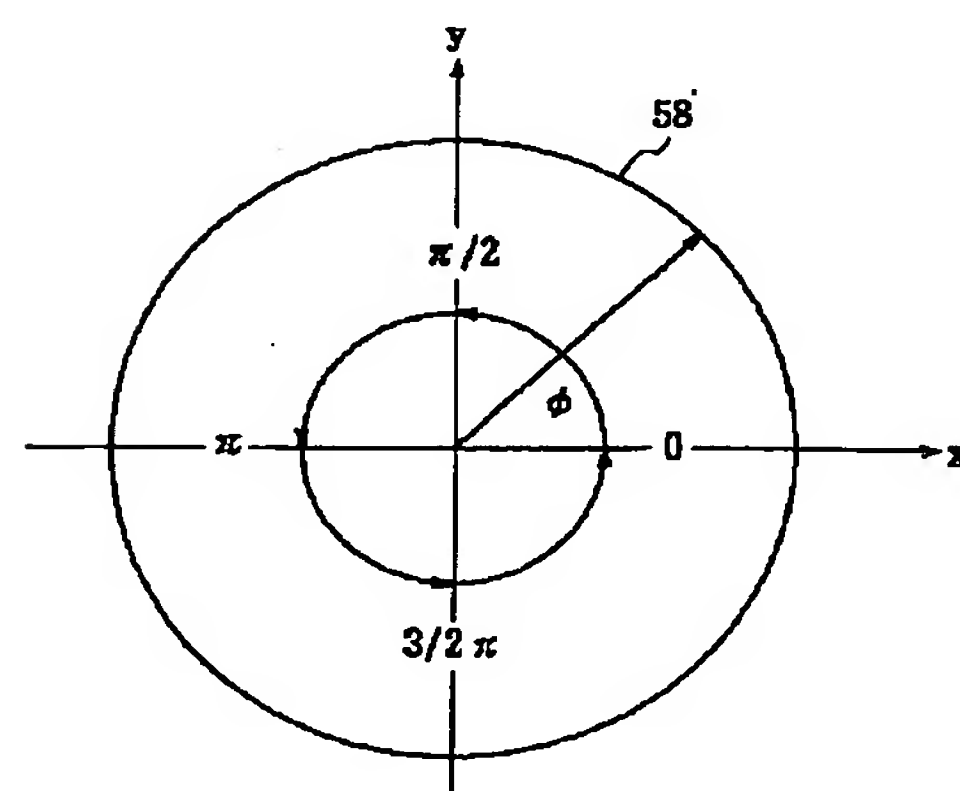
【図13】



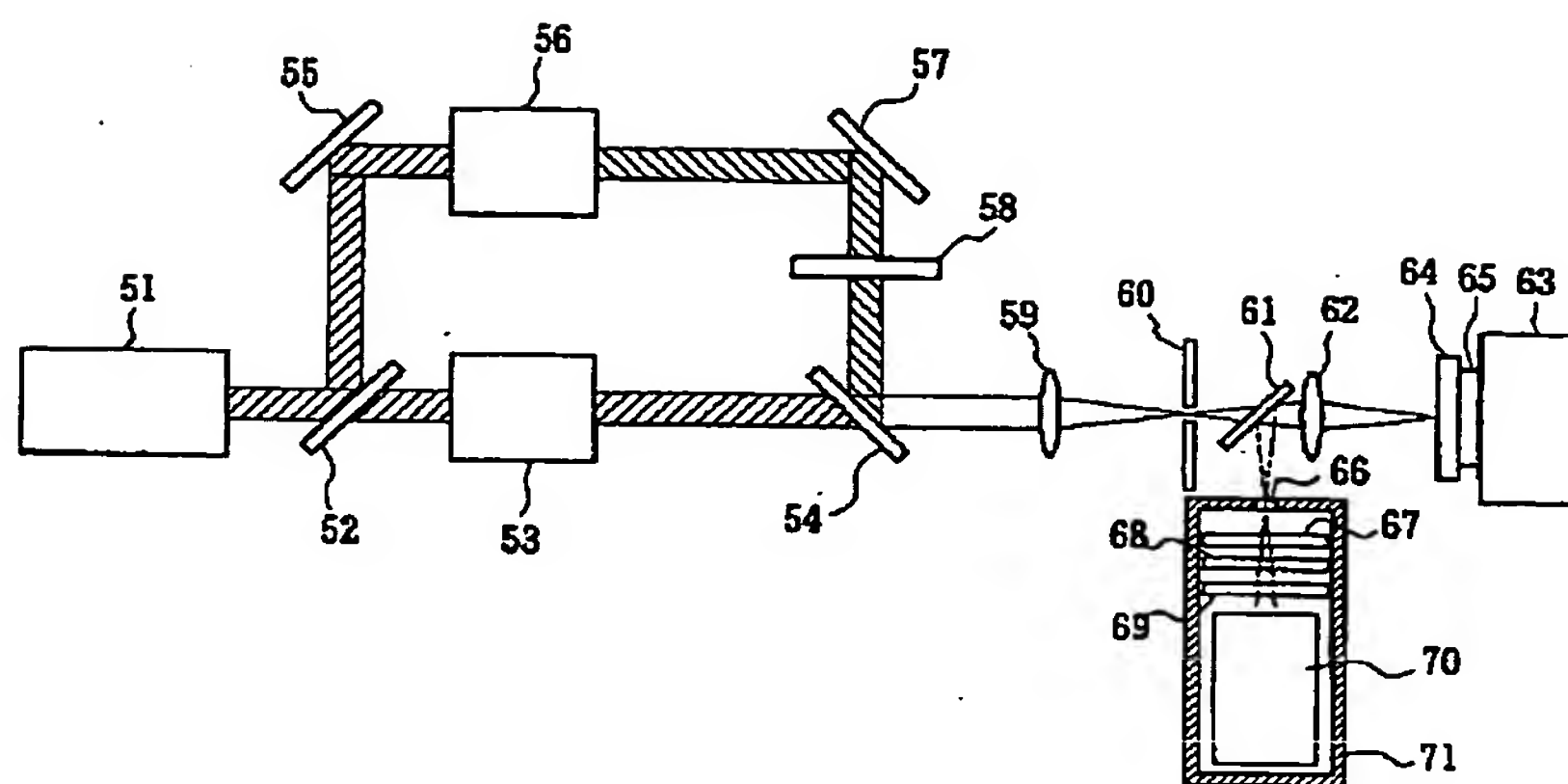
【図14】



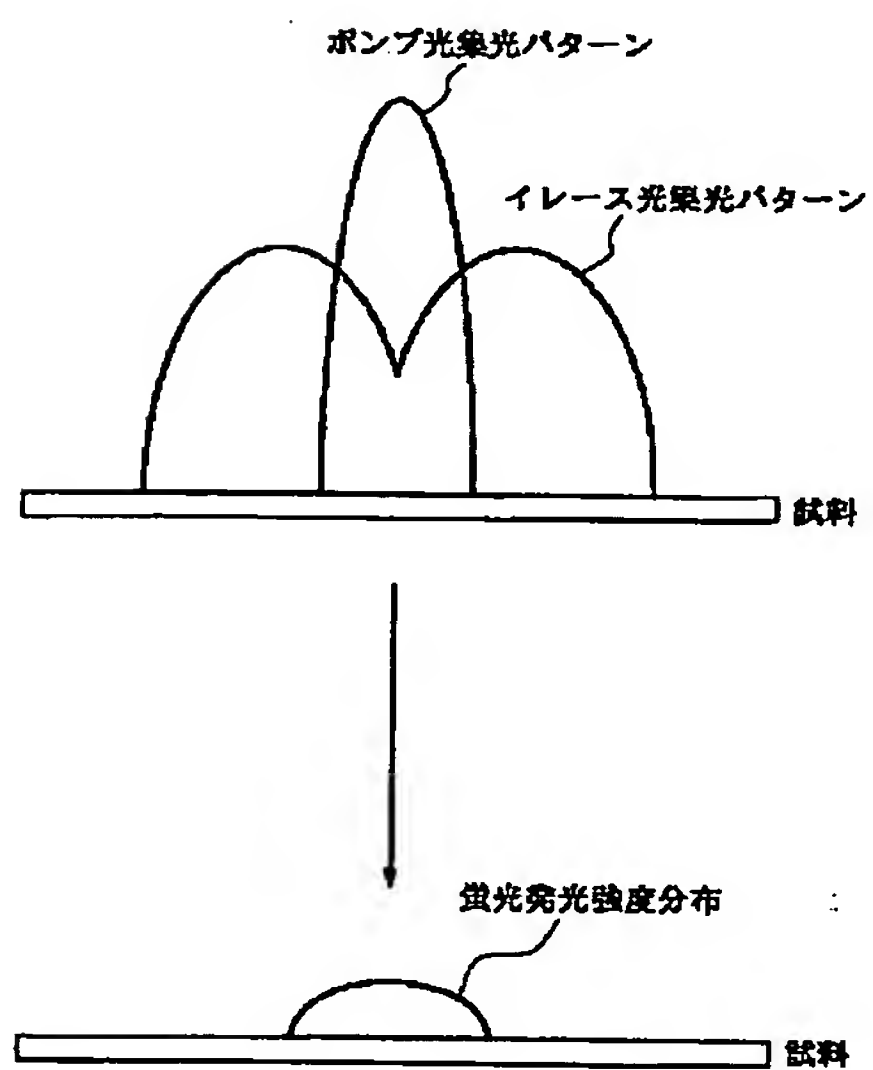
【図16】



【図15】



【図17】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷
// G01N 21/17

識別記号
620

F I
G01N 21/17

テーマコード(参考)

A
620

F ターム(参考) 2G020 CA01 CB23 CB43 CC02 CD04
CD24 CD52
2G043 AA03 CA09 EA01 FA01 FA02
GA02 GA04 GA06 GA08 GB01
HA01 HA09 HA15 JA04 KA02
KA05 KA08 KA09 LA03 LA07
MA11
2G059 AA05 DD03 DD13 EE07 FF02
FF03 FF13 GG01 GG08 GG09
HH02 HH06 JJ05 JJ07 JJ11
JJ22 JJ30 KK04 LL10
2H052 AA07 AA08 AA09 AC04 AC10
AC11 AC14 AC34 AF02

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-062261

(43)Date of publication of application : 28.02.2002

(51)Int.Cl.

G01N 21/64
G01J 3/443
G02B 21/00
G02B 21/06
// G01N 21/17

(21)Application number : 2000-249320

(71)Applicant : OLYMPUS OPTICAL CO LTD

(22)Date of filing : 21.08.2000

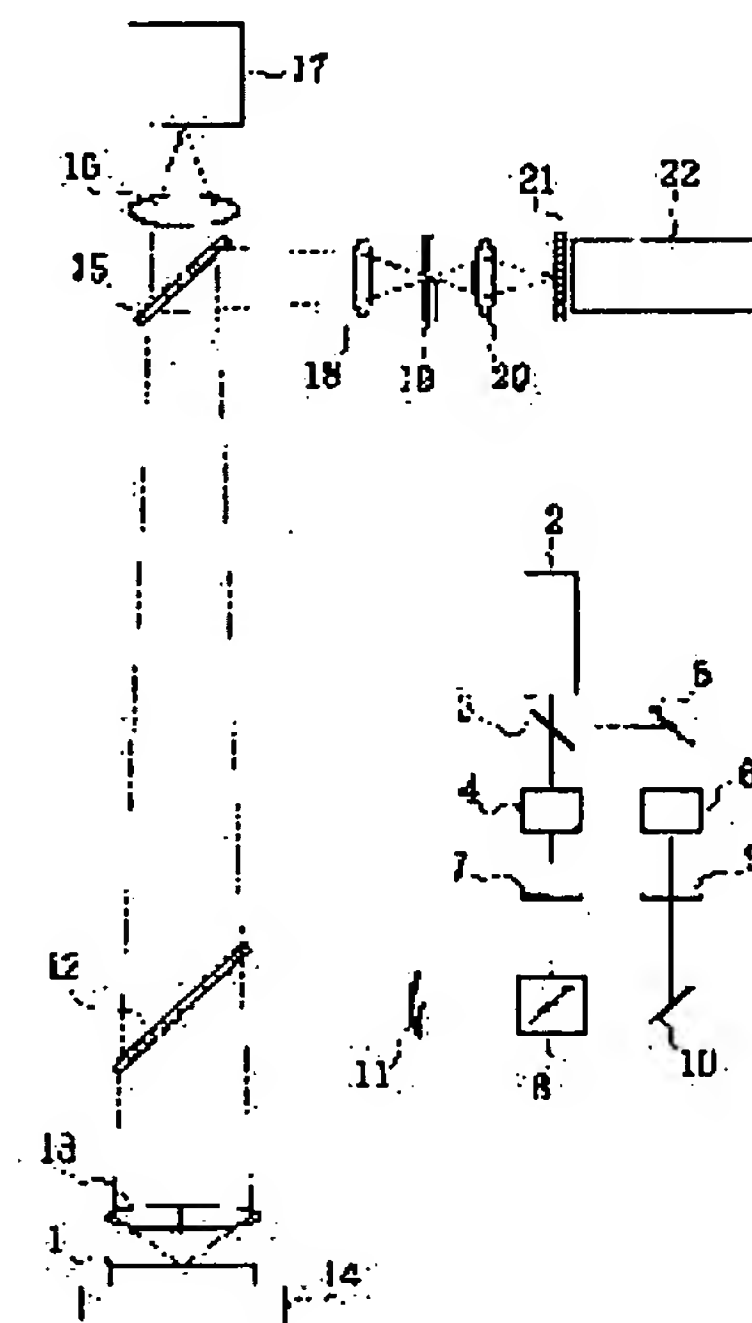
(72)Inventor : IKETAKI YOSHINORI

(54) OPTICAL SYSTEM AND MICROSCOPE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To make a super-resolution property excellent in image-forming performance exhibited easily by simple constitution.

SOLUTION: This system has light source means 2, 3, 4, 6, 8 for generating plural lights different in wavelengths, a converging means 13 for converging the plural lights toward an object 1, and a photodetecting means 17 for detecting the lights emitted from the object 1. At least one light out of the plural lights different in their wavelengths generated by the light source means is constituted to be converged as the light for forming a converged pattern of a multi-spatial mode and to make the plural lights overlapped only in a partial area of the converged pattern of the multi-spatial mode spatially with a converged pattern of the another light by the converging means 13.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] A light source means to generate two or more light from which wavelength differs, and a condensing means to condense for two or more above-mentioned light, At least one light as a light in which the condensing pattern in multi-space mode is formed among two or more light from which the wavelength which has a luminescence detection means to detect the light emitted for the above, and is generated from the above-mentioned light source means differs the light of these plurality -- the above-mentioned condensing means -- some condensing patterns in the above-mentioned multi-space mode -- the optical equipment characterized by constituting so that the above-mentioned object may be made to condense so that only a field may put on other condensing patterns and space targets of light.

[Claim 2] The 1st light source which generates the 1st light of wavelength λ_1 which it is [light] the microscope which observes the sample dyed by the molecule which has three electronic states including a ground state at least, and makes the above-mentioned molecule change from a ground state to the 1st excitation state, The 2nd light source which generates the 2nd light of wavelength λ_2 which makes the above-mentioned molecule change from the 1st excitation state of the above to the 2nd excitation state with a more high energy level, The condensing optical system which makes the above-mentioned sample condense the 1st light of the above, and the 2nd light, Have the luminescence detector which detects luminescence from the above-mentioned molecule, and the light in which the condensing pattern in multi-space mode is formed as the 1st light of the above from the 1st light source of the above is generated. The condensing pattern of the 1st light of the above is the microscope characterized by constituting so that the above-mentioned sample may be made to condense so that only a field may put on the condensing pattern and space target of the 2nd light of the above a part by the above-mentioned condensing optical system.

[Claim 3] The microscope according to claim 2 characterized by the 1st light source of the above and the 2nd light source being sources of coherent light.

[Claim 4] The microscope according to claim 3 characterized by having the phase distribution generating component which gives phase distribution to the wave front of the 1st light of the above-mentioned wavelength λ_1 .

[Claim 5] The above-mentioned phase distribution generating component is a microscope according to claim 4 characterized by having the field where the plurality in which a wave front has zero or the phase contrast of π was divided.

[Claim 6] The field by which division was carried out [above-mentioned] is a microscope according to claim 5 characterized by having the phase contrast of an adjoining field and π .

[Claim 7] The microscope of any one publication of six from claim 2 to which the 2nd light of the above is also characterized by having the condensing pattern in multi-space mode.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the microspectral device which aimed at improvement in detection sensitivity and spatial resolving power in more detail about optical equipment and a microscope by operating the wave front of two waves of light in a microspectral device like the fluorescence microscope of super resolution using two waves of different light, and making a sample side condense.

[0002]

[Description of the Prior Art] The technique of an optical microscope is old and the microscope of various types has been developed. Moreover, in recent years, the still more highly efficient microscope system is developed by advance of circumference techniques including a laser technique and electronic imaging technology.

[0003] In the inside of such a background, for example, JP,8-184552,A, the highly efficient microscope which made possible not only control of the contrast of the image obtained but the chemical analysis is proposed using the double resonance absorption process emitted by illuminating a sample with two or more waves of light.

[0004] This microscope chooses a specific molecule using double resonance absorption, observes the absorption and the fluorescence resulting from specific optical transition, and explains that principle with reference to drawing 9 - drawing 17 . Drawing 9 shows the electronic structure of the valence-electron orbit of the molecule which constitutes a sample, and is first taken as the 1st excitation state (S1 condition) which excites the electron of the valence-electron orbit which the molecule of the base (S0) shown in drawing 9 has by light, and is shown in drawing 10 . Next, it considers as the 2nd excitation state (S2 condition) which excites similarly by the light of another wavelength and is shown in drawing 11 . According to this excitation state, a molecule returns to a ground state, as light is emitted and fluorescence or phosphorescence is shown in drawing 12 .

[0005] In the microscopic method using a double resonance absorption process, an absorption image and a luminescence image are observed using the absorption process of drawing 10 , the fluorescence of drawing 11 , or luminescence of phosphorescence. Although S1 condition is made to excite the molecule which constitutes a sample from light of a resonance wavelength λ_1 like drawing 10 by laser light etc. first in this microscopic method, the molecularity of S1 condition within unit volume increases in this case as the luminous intensity to irradiate increases.

[0006] Here, since a linear absorption coefficient is given by the product of the absorption cross section per molecule piece, and the molecularity per unit volume, it will depend for the linear absorption coefficient to the resonance wavelength λ_2 irradiated continuously on the luminous intensity of the wavelength λ_1 irradiated first in an excitation process like drawing 11 . That is, the linear absorption coefficient to wavelength λ_2 can be controlled by luminous intensity of wavelength λ_1 . If this irradiates a sample with two waves of light, wavelength λ_1 and wavelength λ_2 , and the transmission image by wavelength λ_2 is photoed, it shows that the contrast of a transmission image is completely controllable by the light of wavelength λ_1 .

[0007] Moreover, when the deexcitation process by the fluorescence or phosphorescence in an excitation state of drawing 11 is possible, the luminescence reinforcement is proportional to the molecularity in S1 condition. Therefore, also when using as a fluorescence microscope, it becomes controllable [image contrast].

[0008] Furthermore, in the microscopic method using a double resonance absorption process, not only control of the above-mentioned image contrast but a chemical analysis is made possible. That is, since the

outermost shell valence-electron orbit shown in drawing 9 has an energy level peculiar to each molecule, wavelength λ_1 will change with molecules and wavelength λ_2 also becomes the thing of a molecule proper at coincidence.

[0009] Since it generally crawls and the wavelength field of the absorption band of the molecule of shoes overlaps here although it is possible to observe to some extent specific absorption image or fluorescence image of a molecule even when illuminating on the conventional single wavelength, exact identification of the chemical composition of a sample is impossible.

[0010] On the other hand, in the microscopic method using a double resonance absorption process, since the molecule which absorbs or emits light with two waves, wavelength λ_1 and wavelength λ_2 , is limited, identification of the chemical composition of a sample more exact than a conventional method is attained. Moreover, since only the light which has a specific electric field vector to a molecule shaft is strongly absorbed when exciting the valence electron, if the polarization direction of wavelength λ_1 and wavelength λ_2 is decided and absorption or a fluorescence image is photoed, the same molecule will also become possible to identification of the direction of orientation.

[0011] Moreover, recently, the fluorescence microscope with the high spatial resolving power which crosses a diffraction limitation using a double resonance absorption process is also proposed as indicated by JP,10-142151,A, for example. Drawing 13 is the conceptual diagram of the double resonance absorption process in a molecule too, the molecule of a ground state S_0 is excited by S_1 which is the 1st excitation state with the light of wavelength λ_1 , and it shows the case where the fluorescence from S_2 is very weak while it shows signs that it is excited by S_2 which is the 2nd excitation state with the light of wavelength λ_2 further.

[0012] In the case of a molecule with optical property as shown in drawing 13, a very interesting phenomenon occurs. Drawing 14 is the conceptual diagram of a double resonance absorption process as well as drawing 13, and the X-axis of an axis of abscissa expresses the breadth of spatial distance, and shows the space field A_1 which irradiated the light of wavelength λ_2 , and the space field A_0 where the light of wavelength λ_2 is not irradiated.

[0013] In drawing 14, in the space field A_0 , many molecules of S_1 condition are generated by excitation of the light of wavelength λ_1 , and the fluorescence which emits light on wavelength λ_3 is seen from the space field A_0 in that case. Since the light of wavelength λ_2 was irradiated, most molecules of S_1 condition are immediately excited by S_2 high-order condition, and the molecule of S_1 condition stops however, existing in the space field A_1 . Such a phenomenon is checked with some molecules. By this, since the fluorescence of wavelength λ_3 is lost completely and there is moreover no fluorescence from S_2 condition from the first, in A_1 field, the fluorescence itself will be controlled completely. Therefore, it becomes only A_0 field that there is fluorescence in a space field.

[0014] This result has very important semantics, when it considers from the applicable field of a microscope. That is, although laser light is condensed to a microbeam with a condenser lens and an observation sample top is scanned in the conventional scanning laser microscope, the size of the microbeam in that case serves as a diffraction limitation decided by the numerical aperture and wavelength of a condenser lens, and the spatial resolving power beyond it cannot be expected theoretically.

[0015] However, in the case of drawing 14, two kinds of light with wavelength λ_1 and λ_2 is spatially doubled in skillful ***, and by controlling a fluorescence field by the exposure of the light of wavelength λ_2 , if its attention is paid to the exposure field of the light of wavelength λ_1 , a fluorescence field will be made more narrowly than the diffraction limitation decided by the numerical aperture and wavelength of a condenser lens, and it will become possible to raise spatial resolving power of it substantially. Therefore, the super resolution microscope using the double resonance absorption process exceeding a diffraction limitation, for example, a fluorescence microscope, becomes possible by using this principle.

[0016] Furthermore, this invention person has also already proposed the new device for raising the super resolution nature of a microscope. That is, it is the proposal of the fluorescence labeler molecule for fully utilizing the function of a super resolution microscope, the exposure timing to the sample of two light of wavelength λ_1 and λ_2 to be used, etc. By this proposal, it has three quantum states including a ground state at least. The fluorescent probe molecule which various molecules with a thermal-relaxation process more dominant than the relaxation process according [the transition when carrying out deexcitation from the high-order energy state except the 1st excitation state to a ground state] to fluorescence dye, The fluorescence from S_1 condition is controlled by exciting and exciting immediately continuously the molecule which the sample to which the chemical bond of the biomolecule which gave the biochemical

dyeing technique was carried out is dyed in the S1 condition to high-order quantum level by the light of wavelength λ_2 with the light of wavelength λ_1 . Thus, the optical property of a molecule is used and improvement in spatial resolving power is aimed at by controlling a spatial fluorescence field artificially.

[0017] The optical property of such a molecule can be explained from a quantum chemistry-position. That is, generally each atom with which a molecule constitutes it is tied by sigma or pi bonding. In other words, the molecular orbital of a molecule has sigma molecular orbital or pi molecular orbital, and is bearing the important role with which the electron which exists in these molecular orbitals combines each atom. Among those, but, the electron of sigma molecular orbital combined each atom strongly, and has determined the interatomic distance of the intramolecular which is the frame of a molecule. It is rather bound to the whole molecule by the very weak force without almost contributing the electron of pi molecular orbital to association of each atom to it.

[0018] If the electron which is present in sigma molecular orbital is excited with light in many cases, atomic spacing of a molecule will change a lot and the big structural change including dissociation of a molecule will take place. As the result, most of atomic kinetic energy and the energy which light gave to the molecule for the structural change change to heat energy. Therefore, excitation energy is not consumed with the gestalt of a light called fluorescence. Moreover, since a structural change of a molecule takes place to a high speed (shorter than psec) extremely, the life will be very short even if fluorescence occurs in the process.

[0019] To it, even if it excites the electron of pi molecular orbital, the structure of a molecule itself hardly changes, but it remains in high-order quantum discrete ranking for a long time, and has the property which emits and carries out deexcitation of the fluorescence by the order of nsec.

[0020] According to the quantum chemistry, it is equivalent that a molecule has pi molecular orbital and to have a double bond, and it becomes a requirement to select the molecule which has a double bond in the fluorescence labeler molecule to be used at abundance. It is confirmed [in / in the molecule in which this has a double bond / 6 membered-ring molecules, such as benzene and pyrazine,] that the fluorescence from S2 excitation state is very weak (for example, M.Fujii et.al.Chem.Phys.Lett.171 (1990) 341).

[0021] Therefore, if the molecule containing 6 membered-ring molecules, such as benzene and pyrazine, is selected as a fluorescence labeler molecule, the life time of fluorescence from S1 condition is long, and since the fluorescence from a molecule can be easily controlled by moreover exciting in the S2 condition from S1 condition by optical pumping, super resolution nature can be used effectively. That is, if it observes by these fluorescence labeler molecule dyeing, since the fluorescence image of a sample is not only observable with resolution between altitude, but only the specific chemistry organization of a biological material can dye alternatively by adjusting the chemical group of the side chain of the molecule, analysis becomes possible to the detailed chemical composition of a sample.

[0022] Moreover, since a double resonance absorption process generally happens only when wavelength, a polarization condition, etc. of 2 light fulfill specific conditions, the structure of a molecule can be known very much in a detail by using this. That is, there is a correlation with strong polarization direction of light and direction of orientation of a molecule, and when the polarization direction of its that of the light of 2 wavelength and the direction of orientation of a molecule make a specific include angle, a double resonance absorption process happens strongly. Therefore, since extent of disappearance of fluorescence changes by irradiating the light of 2 wavelength at coincidence at a sample, and rotating the polarization direction of its it light, the information on the space orientation of an organization which it is going to observe from the situation can also be acquired. This can also adjust the light of 2 wavelength.

[0023] As mentioned above, according to the proposal of the point by this invention person, it turns out that it has the analysis capacity for it to be high besides super resolution nature. Furthermore, with devising the exposure timing of two light with wavelength λ_1 and λ_2 , S/N can be improved, and fluorescence control can be caused effectively, and it becomes possible to discover super resolution nature more effectively.

[0024] Drawing 15 shows the configuration of an example of the super resolution microscope concerning the proposal of this invention person's point mentioned above. In this super resolution microscope, laser light from Nd:YAG laser 51 is carried out by the half mirror 52 for 2 minutes. Incidence of one of these is carried out to a dichroic mirror 54 through the wave generator 53 3 times. Incidence of another side is carried out to a dichroic mirror 54 through a mirror 55, the Raman shifter 56, a mirror 57, and a phase plate 58. The laser light from the 3 time wave generator 53, Spatially the laser light which penetrated the phase plate 58 with a dichroic mirror 54 Superposition, The sample 65 held by cover glass 64 on the migration stage 63 is made to condense the piled-up laser light through a condensing lens 59, a pinhole 60, a dichroic

mirror 61, and an objective lens 62. In addition, as a phase plate 58 is shown in drawing 16, it is formed so that phase contrast π may be given to an optical axis in a point symmetric position, and the sample 65 is beforehand dyed by the fluorescence labeler molecule.

[0025] Moreover, a dichroic mirror 61 separates with an outward trip through an objective lens 62, and the fluorescence emitted from a sample 65 is receiving light by the photograph mull 70 through a pinhole 66, a sharp cut filter 67, a band pass filter 68, and a notch filter 69. In addition, a sharp cut filter 67, a band pass filter 68, a notch filter 69, and the photograph mull 70 are held in the protection-from-light box 71, and form the pinhole 66 in this protection-from-light box 71.

[0026] The super resolution microscope shown in drawing 15 the laser light from the wave generator 53 3 times As an IRESU light which considers as the pump light which excites a fluorescence labeler molecule from S0 condition to S1 condition, and excites the laser light from the Raman shifter 56 from S1 condition to S2 condition Form this IRESU light into a hollow beam with a phase plate 58, and fluorescence other than superposition and near [where IRESU luminous intensity serves as zero on a sample 65 by this] the optical axis is controlled on pump light and a space target with a dichroic mirror 54. Only the fluorescence labeler molecule which exists in a field [as a result] narrower than the breadth of pump light is observed by super resolution.

[0027]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, according to the various experiment examination by this invention person, it became clear that there was a point which should be further improved in respect of the image formation engine performance in various kinds of super resolution microscopes mentioned above. For example, a hollow beam is formed by letting the phase plate 58 which showed IRESU light to drawing 16 pass under the super resolution microscope shown in drawing 15, and, thereby, it is difficult for pump light and a space target to make reinforcement of the center section of IRESU light perfect in fact at zero, although a theory top is a very elegant approach since fluorescence other than superposition and near [where IRESU luminous intensity serves as zero on a sample 65] the optical axis is controlled.

[0028] Since the reason cannot process a phase plate 58 ideally as a design value, it is because phase contrast π cannot be given to a beam optical axis in a point symmetric position and electric field strength cannot be offset completely. For this reason, a part not to offset each other among the light waves which are in a point symmetric position to a beam optical axis remains on an optical axis, residue which moreover is not offset to the light wave of the component of omnidirection angle 2π centering on a beam optical axis will accumulate on an optical axis, and as shown in drawing 17 as a result, the electric field strength which cannot be disregarded in the center of a beam optical axis, either will occur.

[0029] Therefore, even if it is going to overlap pump light and IRESU light in respect of a sample and you are going to make it discover super resolution nature in such the condition using fluorescence serological inhibition reaction, the fluorescence intensity in the pump light center section falls, super resolution nature becomes weak as a result, and it becomes as [be / rather / the evil by the fall of the amount of the whole fluorescence signal / conspicuous].

[0030] This invention was made in view of this point, is an easy configuration and aims at offering the optical equipment and the microscope which can discover easily super resolution nature with the good image formation engine performance.

[0031]

[Means for Solving the Problem] Invention of the optical equipment concerning claim 1 which attains the above-mentioned purpose A light source means to generate two or more light from which wavelength differs, and a condensing means to condense for two or more above-mentioned light, At least one light as a light in which the condensing pattern in multi-space mode is formed among two or more light from which the wavelength which has a luminescence detection means to detect the light emitted for the above, and is generated from the above-mentioned light source means differs The light of these plurality is characterized by the thing of the condensing pattern in the above-mentioned multi-space mode constituted so that the above-mentioned object might be made to condense so that only a field may put a part on other condensing patterns and space targets of light with the above-mentioned condensing means.

[0032] Invention of the microscope concerning claim 2 is a microscope which observes the sample dyed by the molecule which has three electronic states including a ground state at least. The 1st light source which generates the 1st light of wavelength λ_1 which makes the above-mentioned molecule change from a ground state to the 1st excitation state, The 2nd light source which generates the 2nd light of wavelength λ_2 which makes the above-mentioned molecule change from the 1st excitation state of the above to the 2nd excitation state with a more high energy level, The condensing optical system which makes the

above-mentioned sample condense the 1st light of the above, and the 2nd light, Have the luminescence detector which detects luminescence from the above-mentioned molecule, and the light in which the condensing pattern in multi-space mode is formed as the 1st light of the above from the 1st light source of the above is generated. It is characterized by the thing of the condensing pattern of the 1st light of the above constituted so that the above-mentioned sample might be made to condense so that only a field may put a part on the condensing pattern and space target of the 2nd light of the above according to the above-mentioned condensing optical system.

[0033] Invention concerning claim 3 is characterized by the 1st light source of the above and the 2nd light source being sources of coherent light in a microscope according to claim 2.

[0034] Invention concerning claim 4 is characterized by having the phase distribution generating component which gives phase distribution to the wave front of the 1st light of the above-mentioned wavelength λ 1 in a microscope according to claim 3.

[0035] In a microscope according to claim 4, as for invention concerning claim 5, the above-mentioned phase distribution generating component is characterized by a wave front having the divided field of plurality with zero or the phase contrast of π .

[0036] The field where division of the invention concerning claim 6 was carried out [above-mentioned] in the microscope according to claim 5 is characterized by having the phase contrast of an adjoining field and π .

[0037] Invention concerning claim 7 is characterized by the 2nd light of the above having the condensing pattern in multi-space mode in the microscope of any one publication of six from claim 2.

[0038] That is, in this invention, the condensing beam pattern of pump light and/or IRESU light is multimode-ized, it divides into two or more areas spatially, these beams are spatially overlapped in part on a sample condensing field, the fluorescence from the division area of the one section of pump light is controlled, and, thereby, detection of the fluorescence signal from a space field minuter than the size of the diffraction limitation of pump light is enabled.

[0039] If it generally lets the light beam to which the wave front was equal like the laser light source pass in a phase filter with two-dimensional phase distribution, a condensing beam with the space mode of arbitration will be formed. This is a technique already put in practical use in the field of an optical information technology (for example, T.M.Turpin et.al.Rroc.SPIE, 3073 (1997) 178-184).

[0040] For example, as shown in drawing 1 , the inside of a condensing beam is multimode-ized and pump light is divided into two. Similarly, IRESU light is also divided into two. It means controlling the fluorescence from that part completely in these two beams, if only 1 division field is piled up, and improving resolution twice.

[0041] Moreover, there is also the approach of trichotomizing, as shown in drawing 2 in addition to this, and spatial resolving power also improves as the high order mode is generated. Furthermore, as shown in drawing 3 , two-dimensional high order space mode and the approach of leaving 1 division field of the pump light by which space division was carried out by forming ** pump light and making the space pattern of IRESU light into the shape of zona orbicularis, overlapping the other field to the exposure field of IRESU light, and eliminating fluorescence are possible.

[0042] Thus, two or more approaches by using the existing technique are possible for multimode-izing the condensing beam pattern of pump light or IRESU light, and dividing it into two or more areas spatially, and, fundamentally, it can be performed by carrying out a wave-front scan using the coherent light to which the wave front was equal.

[0043] One of them is the approach of using a phase plate, and as shown in drawing 1 - drawing 3 , it should just arrange suitably the field where phase contrast π Differs in 0 in the flat surface which intersects the wave front of laser light perpendicularly with an optical axis. π Moreover, what is necessary is to divide a pupil surface into two fields of right-and-left one half, and just to make it the phase contrast of pump light or IRESU light differ mutually, in dividing pump light into two. Thus, if a beam is condensed, the sign of electric field strength will be reversed in the interface of two fields, electric field will serve as zero as a result, and a condensing beam will become a configuration with two peaks. If a pupil surface is divided into three fields and it is π Made similarly for the phase contrast of an adjoining field to differ mutually, as shown in drawing 2 , a condensing beam will become a configuration with three peaks.

[0044] In addition, in order to give the above-mentioned phase contrast, it is possible by approaches, such as ****(ing) an optical thin film of a high refractive index like magnesium fluoride on the glass substrate by which optical polish was carried out, or carrying out chemical etching of the glass substrate directly. In addition, it is also possible for the racer itself which is the light source to use what generates the beam

multimode-ized spatially. That is, the light of the mode pattern in which length has the peak of the plurality [width / n and] of nxm of m can be oscillated by choosing the boundary condition of a laser cavity in a beam cross section. This is called the so-called TEM mode and shows three patterns of the typical TEM mode of a low degree to drawing 4 (a), (b), and (c) (Ohm-Sha: new generation engineering series "laser engineering" 1999, Sadao Nakai work). Thus, since super resolution can be realized without using a phase plate when the laser itself oscillates the beam multimode-ized spatially, the brief microscope structure of a system becomes possible.

[0045]
[Embodiment of the Invention] Hereafter, the gestalt of 1 operation of this invention is explained with reference to drawing 5 - drawing 8 . Drawing 5 is drawing showing the configuration of an example of a microscope. With the gestalt of this operation, the living thing sample 1 dyed by fluorochrome rhodamine 6G is observed. Since rhodamine 6G has the optical property shown in drawing 6 and Table 1, as the light source 2 A laser medium consists of Nd:YAG and the Nd:YAG picosecond laser which carries out outgoing radiation of the laser light (fundamental wavelength: 1064nm) of the pulse width of 30psec extent is used. Light with a wavelength [corresponding to the secondary stokes light which carried out wavelength conversion as the Raman crystal] of 599nm is used as an IRESU light, using light with a wavelength of 532nm which carried out the double wave of this laser light as a pump light. A part of pump light and IRESU light are made to overlap spatially, and are made to condense on a sample 1 with the gestalt of this operation, as space mode of 1x2 which divided pump light and IRESU light into two, respectively, as shown in drawing 1 .

[0046]
[Table 1]
ローダミン 6 G の各エネルギー準位間で遷移が起こるときのおおよそ
の吸収断面積

σ_0 (基底状態から第 1 電子励起状態へ遷移するときの断面積)	10^{-16}cm^2 (532nm) 1)
σ_1 (第 1 電子励起状態から第 2 電子励起状態へ遷移するときの断面積)	10^{-17}cm^2 (599nm) 1)
λ_f (蛍光強度最大値波長)	555nm 1)

1):E.Sahar et.al. IEEE. J.Quantinm Electronics 13,962(1977)

[0047] In drawing 5 , the outgoing radiation light from the Nd:YAG picosecond laser 2 branches with two beams by the beam splitter 3, changes the beam of one of these into a beam with a twice as many wavelength [as this] of 532nm with the KDP crystal 4, and considers as pump light, and the beam of another side is changed into a beam with a wavelength of 599nm by the Raman shifter 6 which consists of a barium-oxide crystal Ba(NO3) 2, and let it be IRESU light, after making it reflect by the mirror 5.

[0048] By passing a phase plate 7, pump light by which outgoing radiation is carried out from the KDP crystal 4 is spatially multimode-ized by 1x2, and carries out incidence to a dichroic mirror 8. As shown in drawing 7 , a phase plate 7 carries out chemical etching of the quartz-glass substrate which carried out optical polish, it constitutes it so that the phase contrast of only pi may be given in two fields which adjoin to pump light with a wavelength of 532nm with the etching depth, and deforms into the beam which multimode-ized pump light spatially.

[0049] Similarly, by passing a phase plate 9, IRESU light by which outgoing radiation is carried out from the Raman shifter 6 is also spatially multimode-ized by 1x2, and carries out incidence of the IRESU light to a dichroic mirror 8 through a mirror 10. A phase plate 9 transforms IRESU light into the beam multimode-ized spatially by carrying out chemical etching of the quartz-glass substrate which carried out optical polish like a phase plate 7, and adjusting the etching depth to IRESU light with a wavelength of 599nm, as shown in drawing 8 .

[0050] The combined harvester and thresher of pump light and the IRESU light is carried out, and the beam which carried out the combined harvester and thresher is made to condense in a dichroic mirror 8 on the sample 1 laid in the sample stage 14 with the objective lens 13 through the relay lens 11 and the half mirror 12.

[0051] Here, the pump light and IRESU light which are condensed on a sample 1 serve as physical relationship shown in drawing 1 , the one half of the pump light spatially multimode-ized by 1x2 overlaps IRESU light and a space target, and, as for the duplication part, fluorescence is controlled. A dichroic mirror 8, a mirror 10, and a half mirror 12 can adjust the spatial superposition of this pump light and IRESU light.

[0052] The fluorescence emitted from a sample 1 makes an objective lens 13, a half mirror 12, and a half mirror 15 penetrate, carries out image formation on the image pick-up side of CCD camera 17 with the image formation lens 16, and enables it to view a fluorescence image by this on the other hand.

[0053] Moreover, the pinhole 19 which is a spatial filter is made to carry out image formation of the fluorescence reflected in part by the half mirror 15 with a lens 18, and image formation of the fluorescence which passed through this pinhole 19 is carried out on the image pick-up side of the ICCD camera 22 through a lens 20 and a transmission grating 21.

[0054] Here, the ICCD camera 22 consists of optical-electronic conversion film and the two-dimensional photomultiplier tube, and fluorescence is photoed with the ICCD camera 22 as a form of a fluorescence spectrum through a transmission grating 21. Therefore, if a fluorescence signal is measured, the data in each point are stored in memory, such as a personal computer, and it is made to display on monitors, such as CRT, carrying out the two-dimensional scan of the sample 1 by the sample stage 14, the structure of the sample 1 made into the purpose can be imaged.

[0055] Since the fluorescence signal of a field far minuter than the laser light which condensed in the sample 1 can be selected according to the microscope of the gestalt of this operation, potential as mensuration can be made very high. moreover -- if what is driven by the piezo-electric element is used as a sample stage 14 - - a location -- since resolution can be made very high with about 10nm, the engine performance which balanced the spatial resolving power of a super resolution microscope enough can be given.

[0056] Furthermore, since the pinhole 19 is arranged to confocal [of microscope optical system] under the microscope of the gestalt of this operation, three-dimension observation of a sample 1 is also possible. That is, since only the fluorescence emitted from the focal location of laser light can be passed, if a pinhole 19 moves the sample stage 14 in the direction of an optical axis and a two-dimensional scan is carried out to laser light, it can obtain the tomogram for the sample 1 in the optical depth direction.

[0057] Moreover, although pump light and IRESU light were obtained from the outgoing radiation light of one Nd:YAG picosecond laser 2, it can also constitute from a gestalt of the above-mentioned implementation so that pump light and IRESU light may be obtained from the separate light source.

[0058]

[Effect of the Invention] as mentioned above, according to this invention, at least one light as a light in which the condensing pattern in multi-space mode is formed among two or more light from which wavelength differs the light of these plurality -- some condensing patterns in multi-space mode -- since it be made to make an object condense so that only a field may put on other condensing patterns and space targets of light , the optical equipment and the microscope which can discover easily super resolution nature with the good image formation engine performance can be obtain with an easy configuration .

[Translation done.]

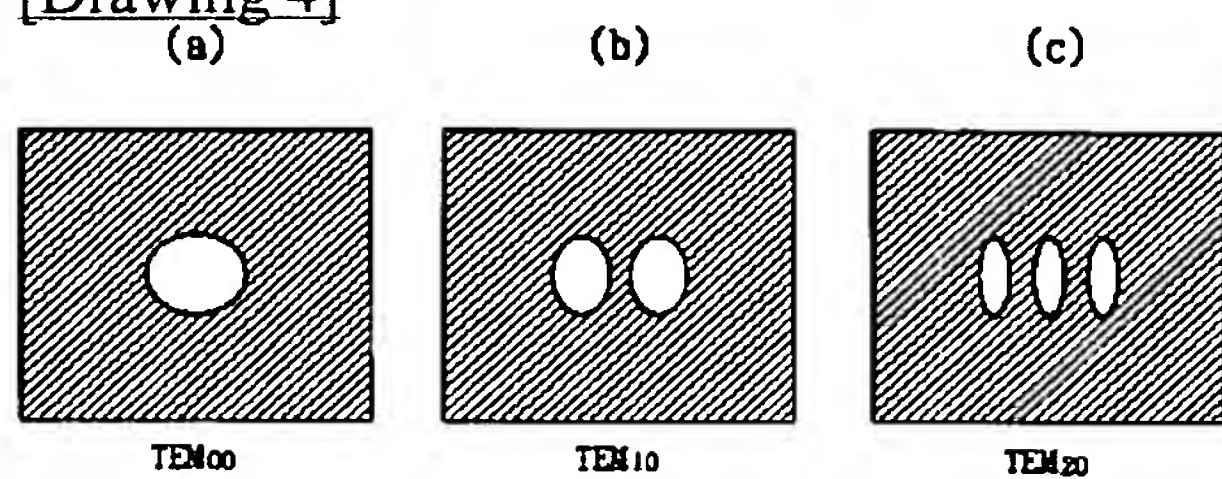
* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

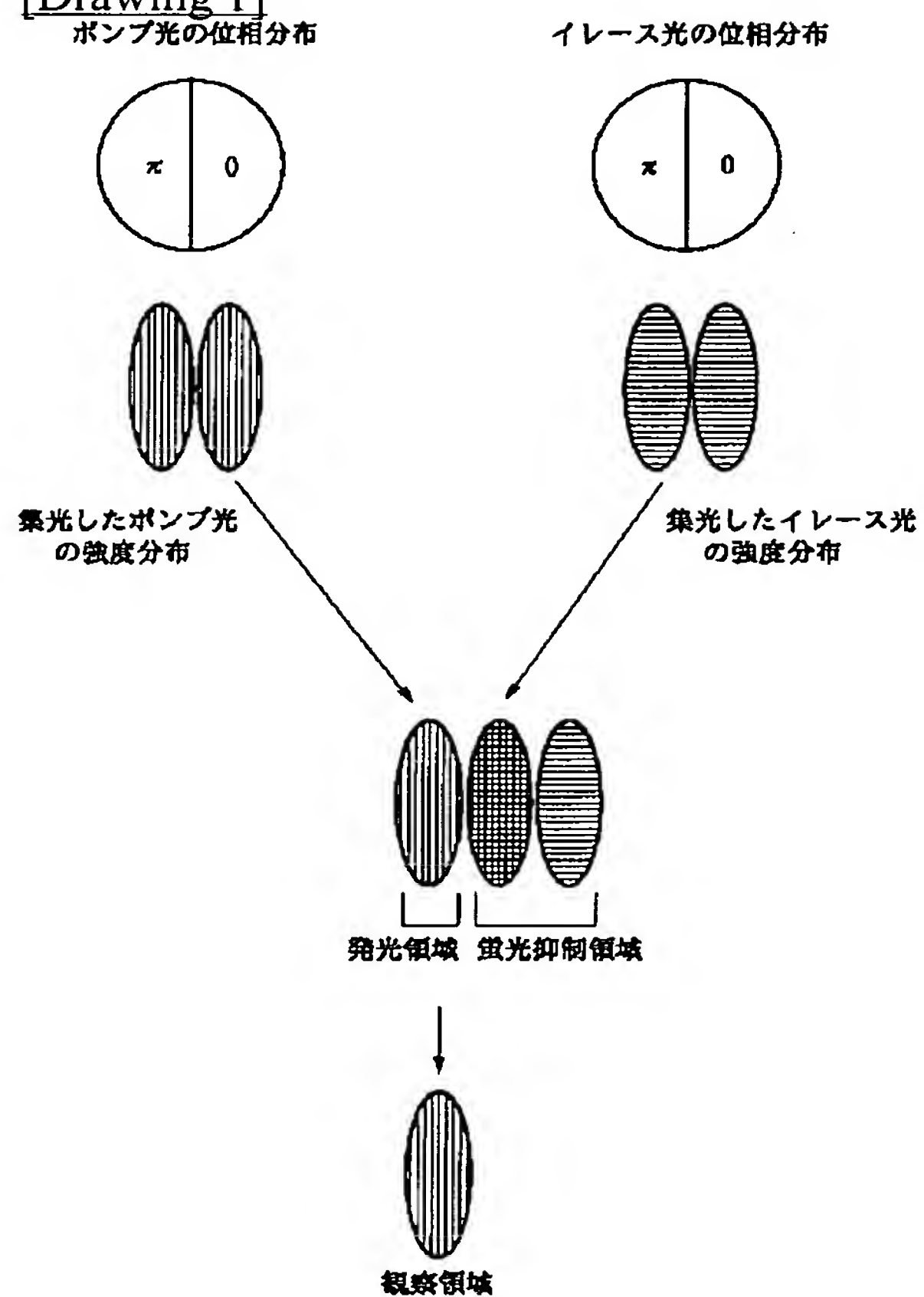
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

[Drawing 4]

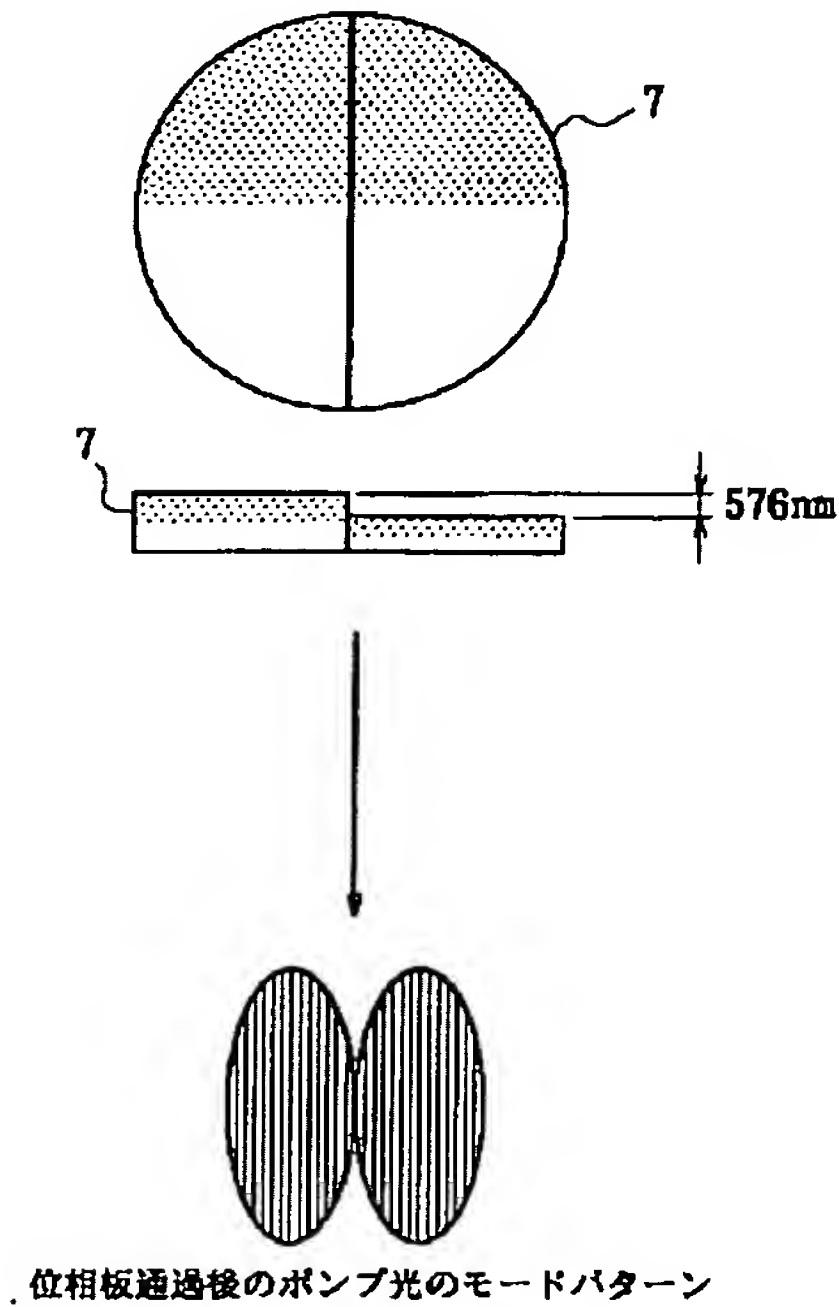


[Drawing 1]

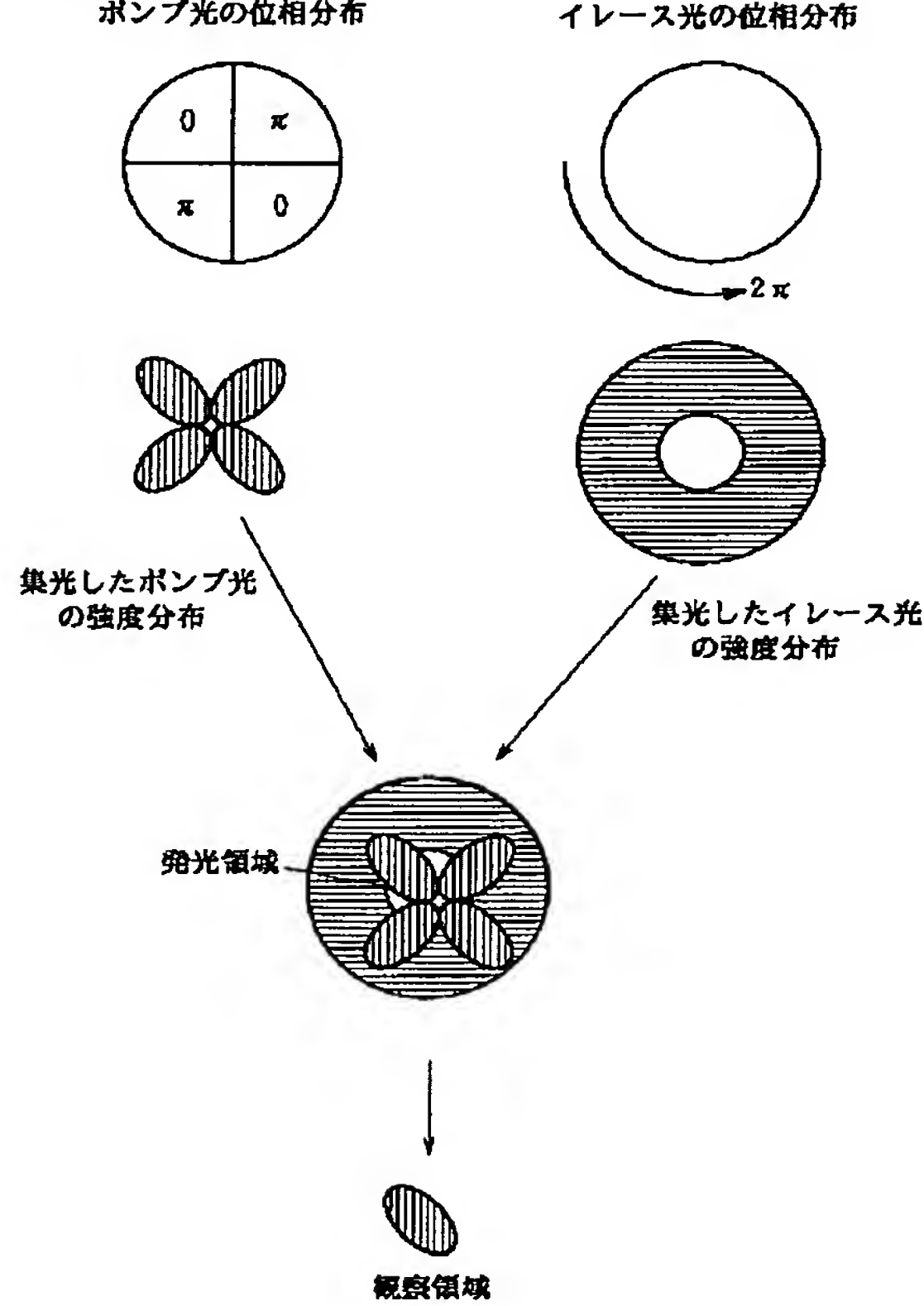


[Drawing 2]

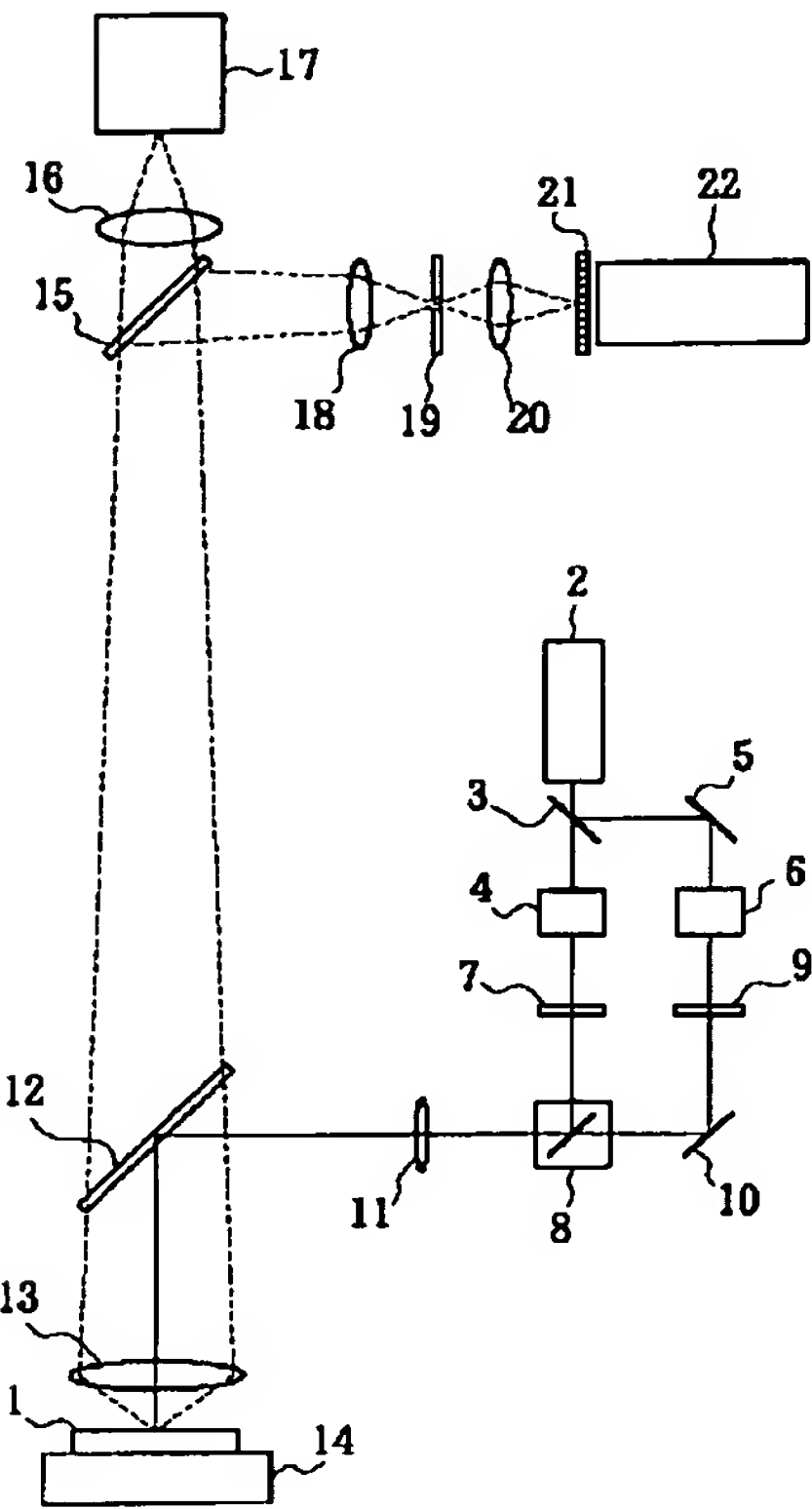




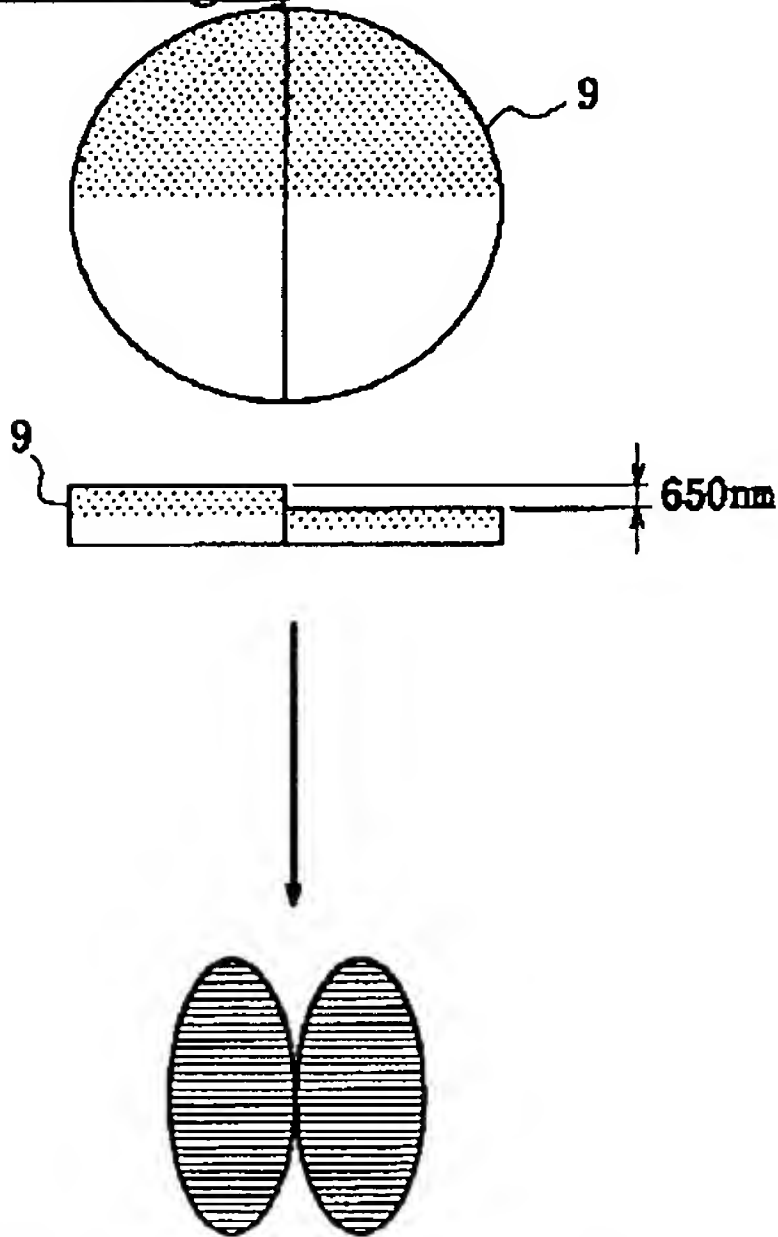
[Drawing 3]



[Drawing 5]

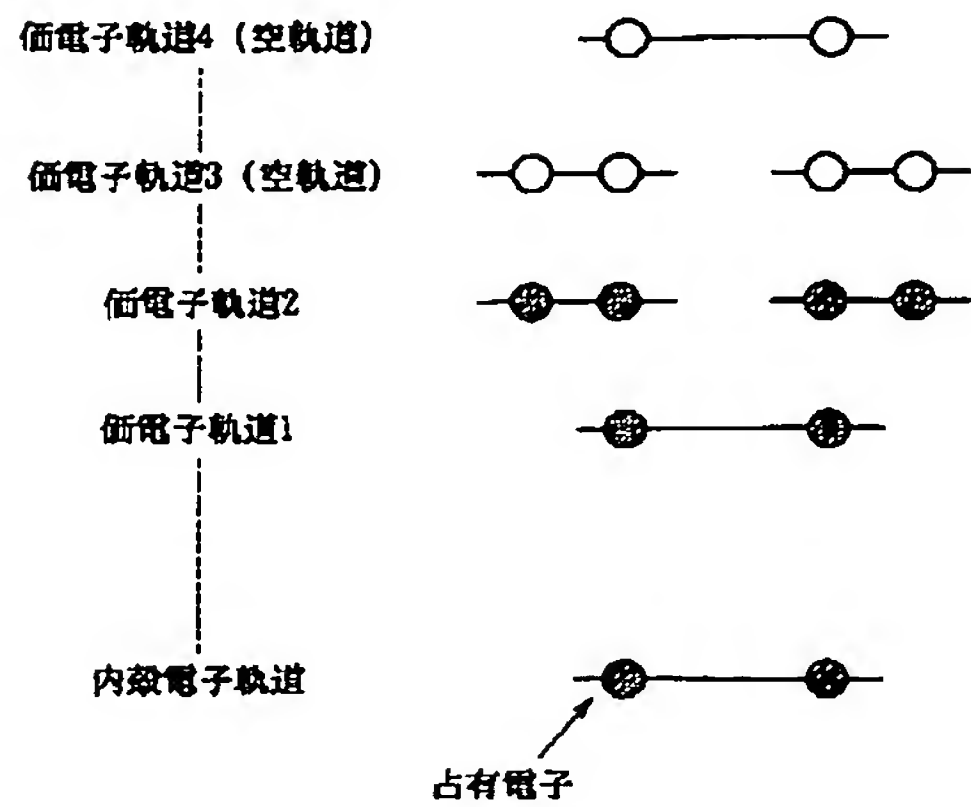


[Drawing 8]

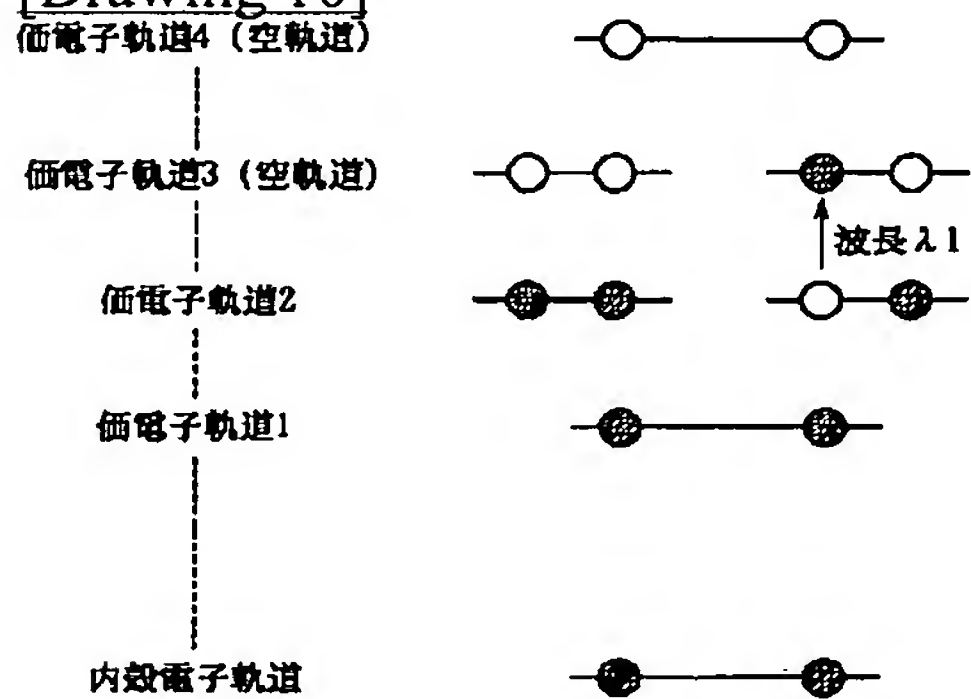


位相板通過後のイレーズ光のモードパターン

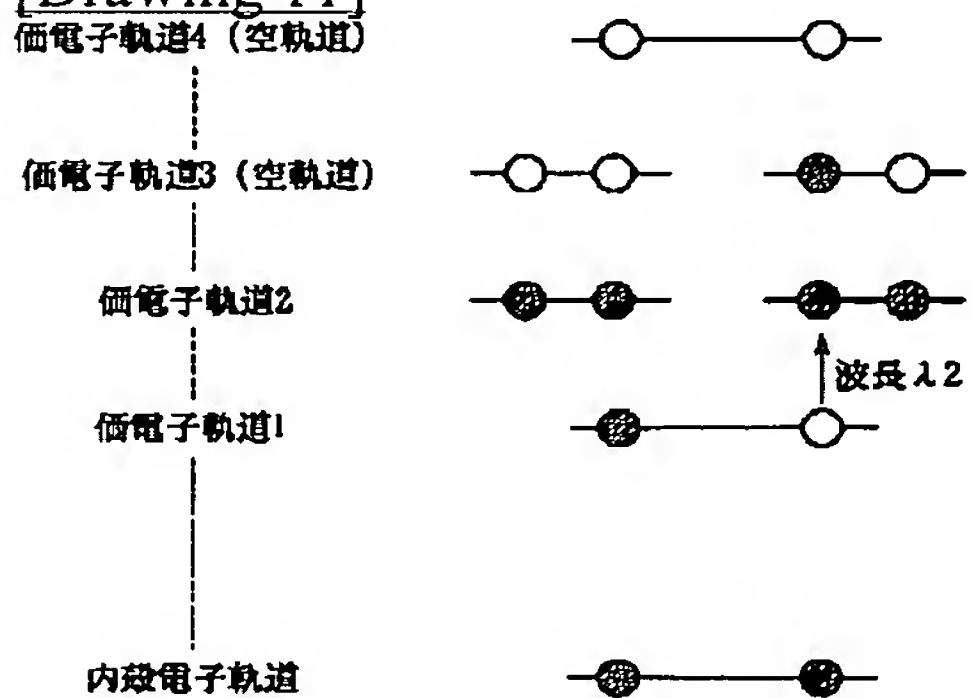
[Drawing 9]



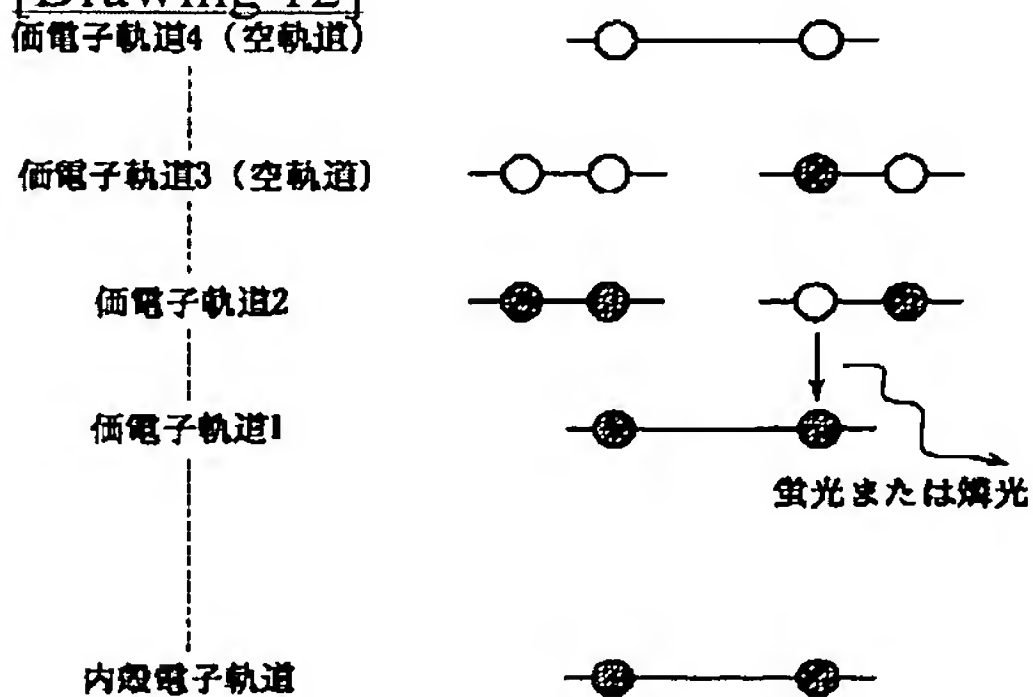
[Drawing 10]



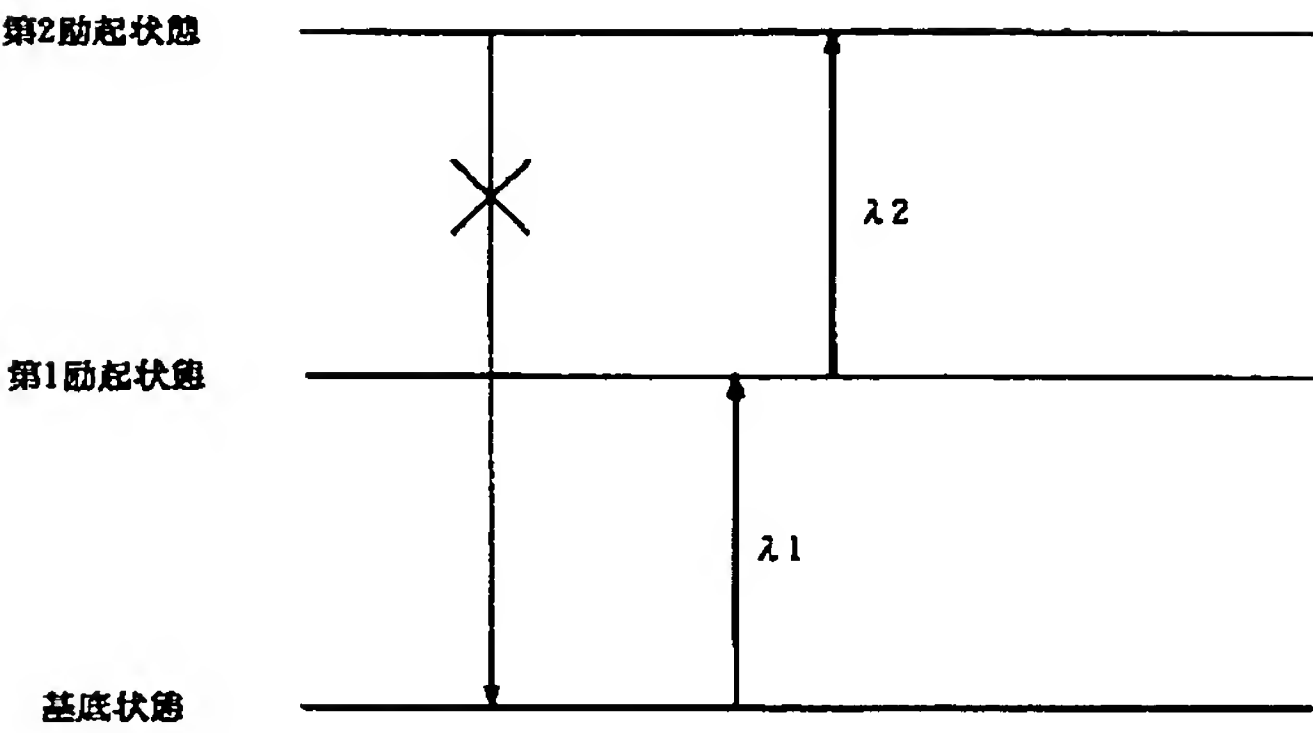
[Drawing 11]



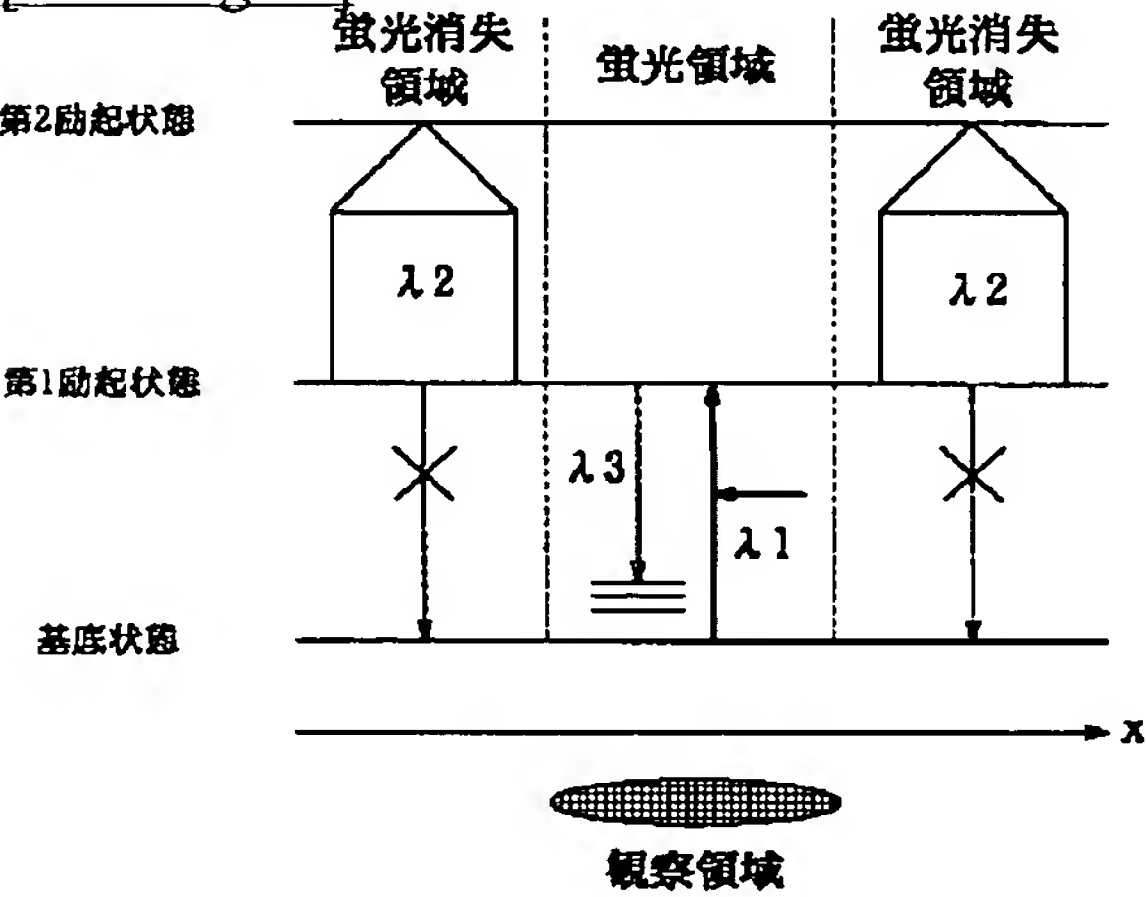
[Drawing 12]



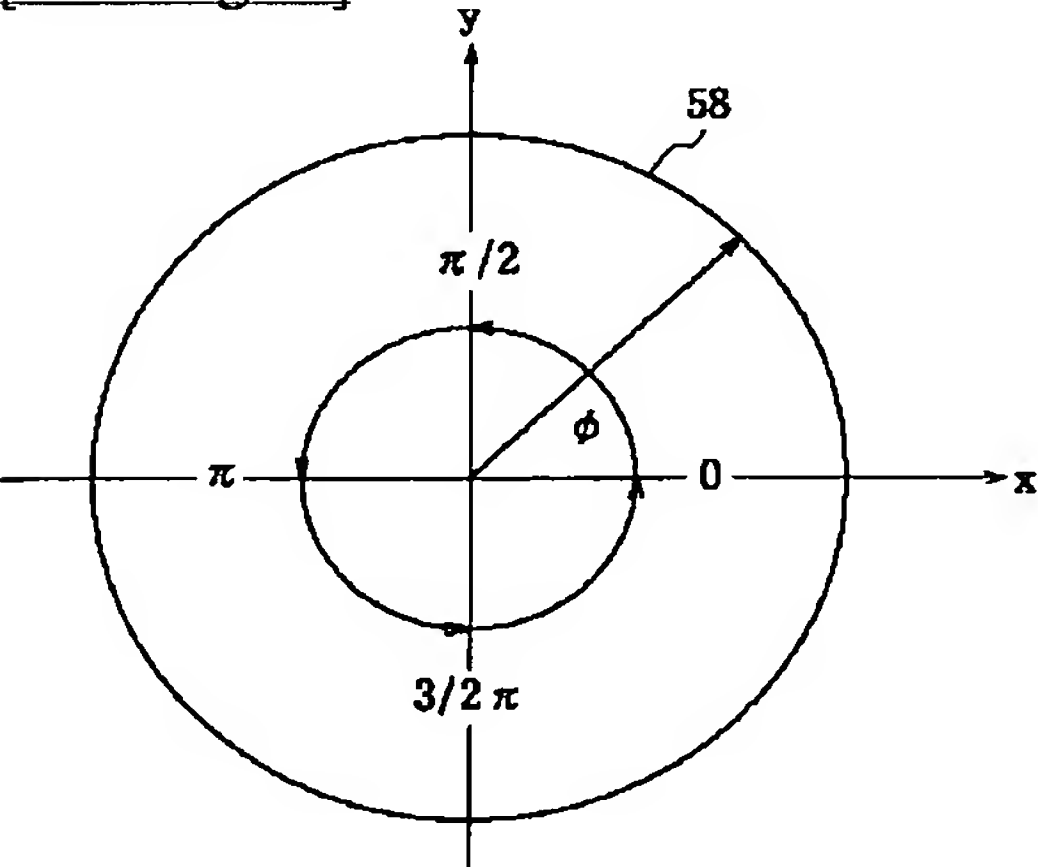
[Drawing 13]



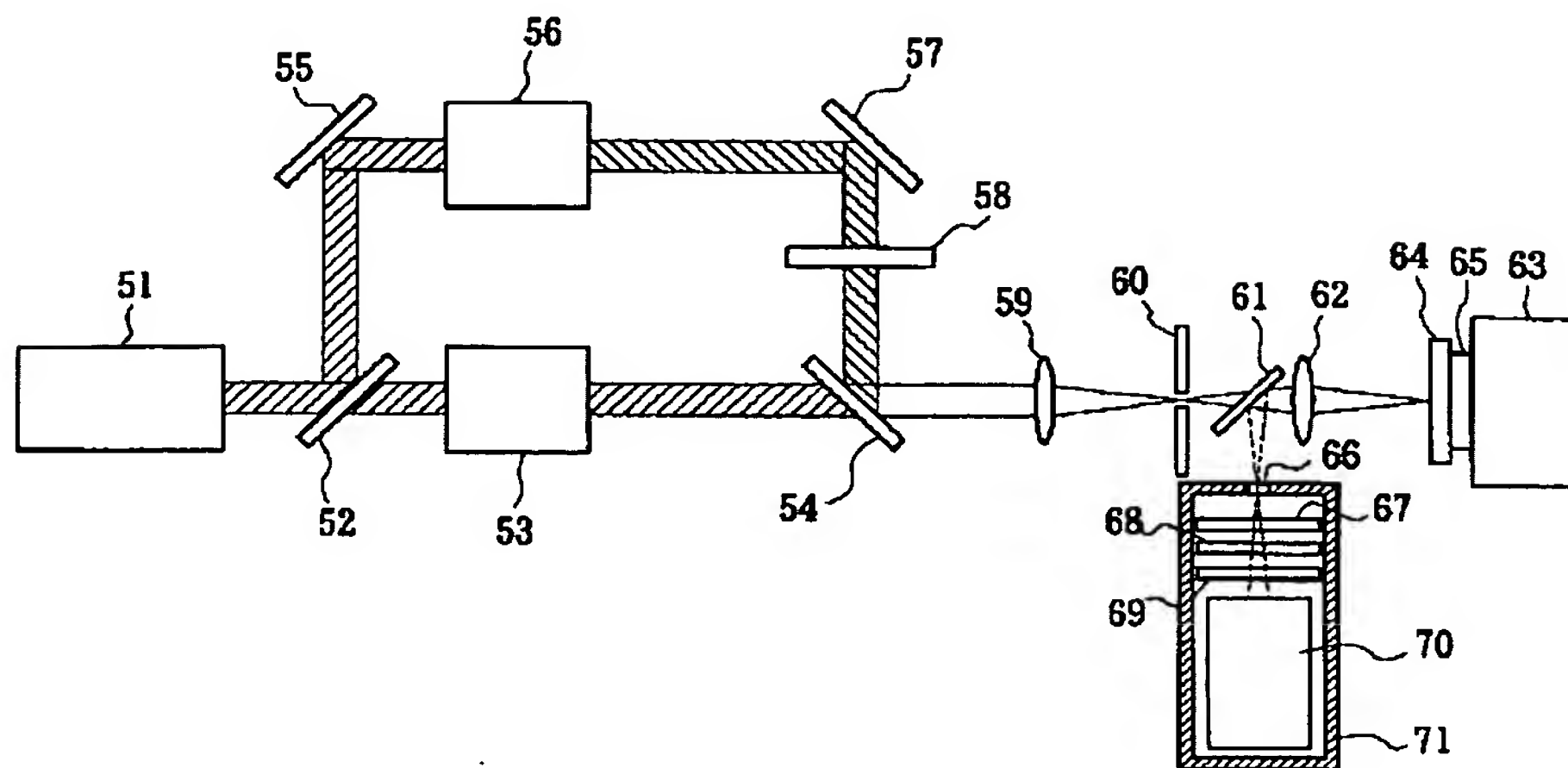
[Drawing 14]



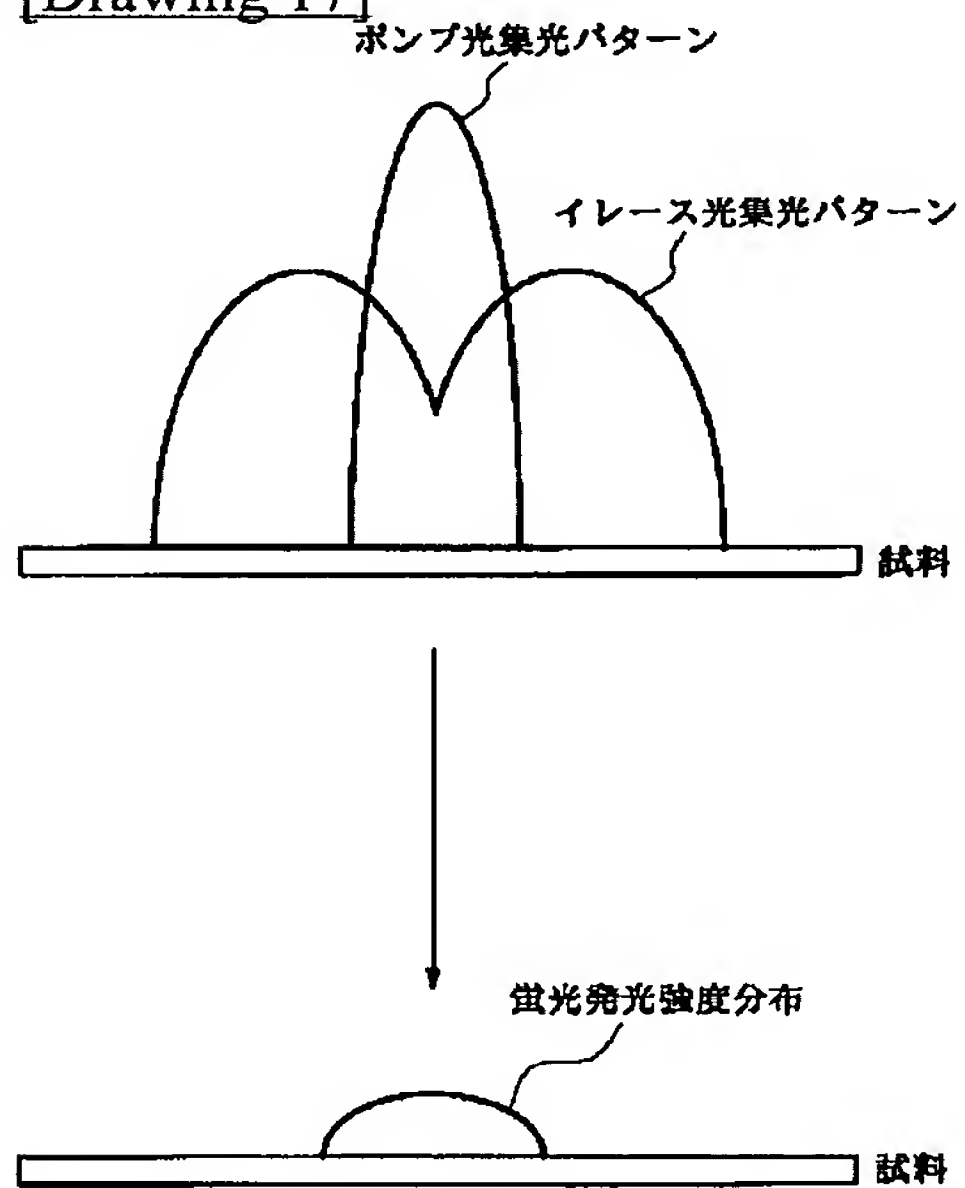
[Drawing 16]



[Drawing 15]



[Drawing 17]



[Translation done.]

BEST AVAILABLE COPY